

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES FORMES PLUS COURTES DE LA PROTÉINE M  
DU VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULEUSE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
JEAN-MICHEL BERGERON GIRARD

AOÛT 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le Dr. Laurent Poliquin. Son ouverture d'esprit et sa disponibilité ont permis la tenue de discussions vraiment enrichissantes sur le plan scientifique, professionnel et humain.

Merci à mes compatriotes de laboratoire : Ian, Rose-Marie et Christian qui sont, d'abord et avant tout devenus mes amis. Chacun à leur façon, ils ont su motiver mes travaux et parsemer mes journées de moments de détente.

Finalement, mille mercis à ma famille et mes amis!!! Votre soutien a été essentiel tout au long de mes études universitaires. Sans vous je n'y serais jamais arrivé.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	ix
RÉSUMÉ .....	xii
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I : .....	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	3
1.1 La famille des Rhabdoviridae .....	3
1.1.1 Phylogénie .....	3
1.1.2 Structure du virion .....	4
1.2 Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) .....	6
1.2.1 Épidémiologie .....	6
1.2.2 Génome .....	7
1.2.3 Cycle de réplication et cytopathogénèse .....	9
1.3 Immunités induites par le VSV .....	13
1.3.1 L'immunité innée .....	13
1.3.2 L'immunité adaptative .....	14
1.3.3 Persistance .....	15
1.3.4 Applications cliniques du VSV .....	15
1.4 La protéine de la matrice (M) du VSV .....	16
1.4.1 Les changements cellulaires induits par la protéine M .....	17
1.4.1.1 L'inhibition de la transcription .....	17
1.4.1.2 L'inhibition du transport nucléo-cytoplasmique .....	18
1.4.1.3 L'inhibition de la traduction .....	20
1.4.1.4 L'arrondissement cellulaire .....	21
1.4.1.5 L'apoptose .....	22

1.4.2 Les formes plus courtes de M .....	23
1.4.2.1 L'initiation interne de la traduction .....	24
1.4.2.1.1 Autres cas connus de protéines virales produites par initiation interne de la traduction : VSV (P) et Sendai (P) .....	27
1.4.2.2 Le « processing » protéolytique .....	28
1.5 Induction de l'apoptose des lignées cellulaires HeLa, BHK-21 et L929 par le VSV .....	29
CHAPITRE II : .....	31
MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	31
2.1 Cellules et culture cellulaire .....	31
2.2 Souches virales .....	31
2.3 Infection .....	32
2.4 Marquage radioactif .....	32
2.5 Récolte et lyse des cellules .....	33
2.6 Immunoprécipitation .....	33
2.7 Purification de l'anticorps monoclonal anti-M (23H12) à partir du surnageant des hybridomes. ....	34
2.8 Purification de la protéine M en vue de l'analyse par spectrométrie de masse et du séquençage de l'extrémité amino-terminale par la méthode de dégradation de Edman.....	35
2.9 Immunobuvardage .....	36
2.10 Test de dégradation de M par la caspase 3 .....	36
2.11 Construction des vecteurs PL6 (amplification par PCR des gènes M2, M3 et M2 (M51R)) .....	37
CHAPITRE III : .....	38
RÉSULTATS .....	38
3.1 Identification des formes plus courtes de M par immunobuvardage .....	38
3.2 Analyse de la dégradation de M par des tests de type « pulse-chase » .....	39

3.3 Test de dégradation de la protéine M par la caspase 3 .....	44
3.4 Analyse de la forme M <sub>fc</sub> du mutant T1026-R1 par la méthode de dégradation de Edman .....	45
3.5 Analyse des formes plus courtes de M par spectrométrie de masse .....	45
3.6 Expression isolée des formes M2, M3 et M2 (M51R) à l'intérieur d'une lignée cellulaire transfectante stable .....	46
CHAPITRE IV : .....	70
DISCUSSION .....	70
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	78
RÉFÉRENCES .....	79

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 .....	6
----------------	---

Structure du virion du virus de la Stomatite Vésiculeuse.

Figure 2 .....	8
----------------	---

Représentation graphique du génome du VSV et transcrits et protéines associées à chaque gène.

Figure 3 .....	49
----------------	----

Immunobuvardages avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine M du VSV sur des extraits protéiques provenant de cellules HeLa et BHK-21 infectées par le VSV (HR).

Figure 4 .....	51
----------------	----

Mise au point des paramètres d'immunoprécipitation.

Figure 5 .....	53 à 55
----------------	---------

Expériences de type « pulse-chase » sur des cellules HeLa et L-929 infectées par le VSV (HR) ou par le VSV (T1026-R1).

Figure 6 .....	57 à 59
----------------	---------

Expériences de type « pulse-chase » sur des cellules HeLa et BHK-21 infectées par le VSV (HR) ou par le VSV (T1026-R1).

Figure 7 .....	61
----------------	----

Expériences de type « pulse-chase » sur des cellules HeLa et BHK-21 infectées par le VSV (T1026-R1).

Figure 8 .....	63
----------------	----

Test de dégradation de la protéine M par la caspase 3.

Figure 9 .....	65
----------------	----

Séquence amino-terminale de la protéine Mfc du VSV (T1026-R1) telle qu'obtenue par la méthode de dégradation de Edman.

Figure 10 .....	67
-----------------	----

Représentation graphique des fragments tryptiques identifiés lors de l'analyse par spectrométrie de masse des différentes formes de M du VSV sauvage (A : HR) et mutant (B : T1026-R1).

Figure 11 .....	69
-----------------	----

Gel d'agarose confirmant l'insertion des gènes M2, M3 et M2 (M51R) dans un vecteurs d'expression inducible.



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I .....	5
-----------------	---

Composition du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) sérotype Indiana et extrapolation du poids moléculaire de chacune de ses protéines à partir de leurs séquences.

Tableau II .....	27
------------------	----

Contexte entourant les trois premiers codons d'initiation de la traduction à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm de la protéine M du VSV.

Tableau III .....	37
-------------------	----

Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes M2 et M3.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

40S	Petite sous-unité ribosomale
a.a.	acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CHO	« Chinese hamster ovary »
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DMP	Diméthylpimélimidate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediamine
eEF	« Eucaryotic elongation factor »
eIF	« Eucaryotic initiation factor »
GDP	Guanine diphosphate
GTP	Guanine triphosphate
HCl	Acide chloridrique
HRP	« Horse radish Peroxydase »
hpi	Heures post-infection
HR	« Heat resistant »
IFN	Interféron
kDa	kilo Dalton
m.o.i	« Multiplicity of infection »

MEM	« Minimum essential medium »
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
μCi	Microcurie
μg	Microgramme
μL	Microlitre
NaCl	Chlorure de sodium
NPC	« Nuclear pore complex »
Nup	Nucléoporine
°C	Degrés celsius
PAGE	« polyacrylamide gel electrophoresis »
PBS	« phosphate buffered saline »
PCR	« polymerase chain reaction »
pen/strep	Pénicilline/streptomycine
pH	Potentiel hydrogène
PKR	« Protein kinase RNA-dependent »
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PSI	« Protein synthesis inhibitor »
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
SDS	« Sodium dodecyl sulfate »
SV	Sérum de veau
T1026-R1	Souche révertante de T1026 (Toronto)

TBP	« TATA-binding protein »
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
VSV	virus de la stomatite vésiculeuse

## RÉSUMÉ

Différentes formes plus courtes de la protéine de la matrice (M) du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) peuvent être produites lors de l'infection de cellules *in vitro* à cause des phénomènes d'initiation interne de la traduction (Jayakar et Whitt, 2002) et de protéolyse (Rosen et al., 1983). L'objectif de la présente étude était de caractériser les formes plus courtes de M produites lors de l'infection de cellules par une souche sauvage du VSV (HR), ou par un variant (T1026-R1) qui possède une mutation sur sa protéine M (M51R). Pour ce faire, des cellules HeLa, BHK-21 et L929 ont été infectées par ces deux variants lors d'expériences séparées. Des immunobuvardages et des tests de type « pulse-chase » ont permis d'observer l'existence d'au moins quatre formes de M à l'intérieur des cellules infectées (M1, M', M'' et Mfc) et ce, indépendamment de la souche virale employée. Lors de l'infection des cellules par la souche sauvage du VSV (HR), les formes M'' et Mfc pourraient être produites par initiation interne de la traduction aux positions 33 et 51 de M, respectivement. L'existence de la forme Mfc, ou d'une protéine de taille semblable, à l'intérieur des cellules infectées par T1026-R1, ne peut cependant pas être expliquée par un événement d'initiation interne de la traduction en position 51 à cause de la mutation M51R. L'origine de cette protéine pourrait être attribuable à l'action de la trypsine ou une autre protéase activée au cours de l'infection. Des expériences de « pulse-chase » en présence de l'inhibiteur z-VAD ont montré que l'apparition de Mfc pouvait dépendre de l'activation des cystéines protéases. L'analyse des séquences des différentes formes de M par dégradation de Edman et par spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier la portion manquante de la protéine. Aussi, afin de tenter de déterminer le rôle physiologique des formes de M produites par initiation interne de la traduction, des vecteurs d'expression inducible des gènes tronqués ont été construits. L'expression de ces protéines à l'intérieur de cellules HeLa transfectantes stables n'a pu être détectée. La protéase impliquée dans la production de la forme Mfc du mutant T1026-R1 reste à identifier ainsi que le rôle des différentes formes plus courtes de la protéine M dans la cytopathogénèse et le cycle de réplication du VSV.

Mots clés : virus stomatite vésiculeuse, protéine matrice, initiation interne de la traduction, protéolyse

## INTRODUCTION

Les virus ont développé une multitude de stratégies leur permettant de maximiser la capacité codante de leurs courts génomes. Plusieurs de ces mécanismes rendent possible la production de protéines virales essentielles au cycle de reproduction et à la cytopathogénèse du virus.

La protéine de la matrice (M) du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) joue un rôle essentiel dans le cycle de reproduction de ce Rhabdovirus. En plus de ses fonctions dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions, M, lorsqu'exprimée dans des cellules en l'absence d'autres facteurs viraux, altère plusieurs mécanismes cellulaires entraînant ainsi différents effets cytopathiques (ECP). Citons notamment le blocage du transport nucléo-cytoplasmique et l'inhibition de la transcription qui entraînent l'arrondissement cellulaire et ultimement, l'apoptose.

Lors de l'infection de cellules *in vitro* par le VSV, trois protéines sont produites à partir de l'ARNm de M à cause du phénomène d'initiation interne de la traduction attribuable à un balayage défectueux des ribosomes. Ces protéines, appelées M1, M2 et M3, ont été caractérisées par Jayakar et Whitt en 2002 et correspondent à l'initiation de la traduction sur les trois premiers codons AUG rencontrés par les ribosomes à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm de M. Ces codons d'initiation de la traduction codent pour les méthionines situées en position 1, 33 et 51 de la protéine M. Les formes plus courtes M2 et M3, auxquelles il manque une portion à l'extrémité amino-terminale, possèdent une extrémité carboxy-terminale identique à celle de la protéine pleine longueur M1. Le rôle de M2 et M3 dans l'infection demeure nébuleux. Toutefois, l'équipe de Whitt suggère qu'elles pourraient être impliquées dans l'arrondissement cellulaire (Jayakar et Whitt, 2002).

Dans le cadre de cette étude, des résultats préliminaires ont permis d'observer la présence de plus de trois formes de M lors de l'infection de cellules HeLa et BHK-21 par le VSV sauvage (HR). De plus, la production de plusieurs formes plus courtes de M lors de l'infection des mêmes lignées cellulaires par le VSV mutant T1026-R1 ne peut être expliquée exclusivement par le phénomène d'initiation interne de la traduction. En effet, ce variant possède une mutation sur le gène codant pour la protéine M (M51R) qui résulte en l'abolition du troisième codon d'initiation permettant la production de la forme M3 décrite ci-haut.

Le présent travail avait donc comme objectif de déterminer de quelle façon les formes plus courtes de la protéine M du VSV sont produites lors de l'infection de cellules *in vitro* et d'identifier leur rôle physiologique. La possibilité que ces formes de M soit le résultat d'un ou des clivages protéolytique a été explorée à l'aide d'expériences de « pulse-chase » et par séquençage. L'information contenue dans la section suivante permettra de situer le lecteur dans le contexte global de l'étude.

# CHAPITRE I

## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1.1 La famille des *Rhabdoviridae*

#### 1.1.1 Phylogénie

Il existe plus de 100 espèces de virus classées dans la famille des *Rhabdoviridae*. Les rhabdovirus possèdent une large distribution dans la nature et peuvent infecter les vertébrés, les invertébrés ainsi que les plantes. Cette famille est séparée en cinq genres : les *Vésiculovirus*, les *Lyssavirus* et les *Éphémérovirus* infectent les animaux alors que les *Cytorhabdovirus* et les *Nucléorhabdovirus* infectent les plantes. Le genre *Vésiculovirus* comprend le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et d'autres virus apparentés, alors que le genre *Lyssavirus* contient, entre autre, le virus de la rage (RV) (Rose et Whitt, 2001). Le genre *Éphémérovirus* ne possède qu'un seul représentant : le virus de la fièvre bovine éphémère (Jayakar et al., 2004).

Les rhabdovirus possèdent un génome non segmenté d'ARN antisens (-). Cette famille est donc classée dans l'ordre des *Mononégavirales* en compagnie des *Paramyxoviridae*, des *Filoviridae* et des *Bornaviridae*. Ce type de virus doit absolument emporter avec lui au moins un exemplaire de sa propre ARN polymérase ARN-dépendante, nécessaire pour débiter la production des ARNm viraux à l'intérieur de la cellule hôte.

Le génome des Rhabdovirus, dont la taille varie entre 11 et 14 kilobases, contient au minimum cinq gènes, dans l'ordre 3'-N-P-M-G-L-5'. Certaines espèces possèdent d'autres gènes; citons notamment les rhabdovirus de poissons



qui possèdent généralement un gène supplémentaire entre G et L (Kurath et al., 1985). La fonction de ces gènes additionnels demeure inconnue.

### 1.1.2 Structure du virion

Typiquement, les rhabdovirus ont une forme de balle de fusil mesurant 180 nm de long par 75 nm de large, excepté quelques virus de plante qui sont bacilliformes et qui peuvent mesurer le double de cette longueur (Jackson et al., 2005). La structure des virions comprend deux composantes majeures : le cœur ribonucléoprotéique (RNP), qui contient le matériel génétique, et l'enveloppe, composée principalement de phospholipides dérivés de la membrane cellulaire hôte et de glycoprotéines virales formant des projections servant à l'attachement du virus (figure 1).

Le cœur RNP est composé du génome viral et des protéines N, P et L. À l'intérieur du virion, le génome est protégé par de multiples exemplaires de la nucléoprotéine (N) et ce complexe est empaqueté sous la forme d'une hélice d'environ 35 tours. Lors de l'assemblage, les protéines P et L demeurent associées aux complexes génomiques afin d'être encapsidées. La protéine P est la phosphoprotéine majeure du virus alors que la protéine L (pour « Large ») est une ARN polymérase ARN-dépendante, aussi responsable de la synthèse de la coiffe 5' et de la queue poly-A des ARNm viraux. Il est à noter que les protéines N, P et L sont toutes trois impliquées dans la transcription et la réplication de génome.

L'enveloppe virale se compose d'une bicouche phospholipidique contenant diverses protéines membranaires. La principale d'entre-elles est la glycoprotéine virale (G) quoique d'autres glycoprotéines peuvent être incorporées dans l'enveloppe virale lors du bourgeonnement (Schnell et al., 1996). La protéine G des rhabdovirus est une glycoprotéine transmembranaire de type I formant des trimères qui pointent vers l'extérieur des particules virales. Elle est responsable de

l'attachement et de l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule hôte et est impliquée dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions.

Quant à la protéine matricielle (M), elle fait le pont entre le cœur RNP et l'enveloppe virale en plus d'être considérée comme le moteur de l'assemblage et du bourgeonnement des virions (Rose et Whitt, 2001).

Le tableau I liste les poids moléculaires des protéines du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) sérotype Indiana, tel qu'extrapolés à partir de leur séquence, ainsi que le nombre de molécules retrouvées par virion. La composition en protéines des particules virales est constante excepté pour G, dont le nombre de molécules par virion peut varier considérablement selon le stade de l'infection. Les particules du VSV produites tôt dans l'infection peuvent contenir jusqu'à trois fois moins de protéine G que celles produites tard dans l'infection (Lodish et Porter, 1980).

Tableau I\*. Composition du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) sérotype Indiana, et extrapolation du poids moléculaire de chacune de ses protéines à partir de leurs séquences.

Protéine	Poids moléculaire calculé (kDa)	Nombre de molécules / virus
N	47,355	1258
P	29,878	466
M	26,064	1826
G	63,416	1205
L	240,707	50

\* Adapté de Rose et Whitt, 2001.

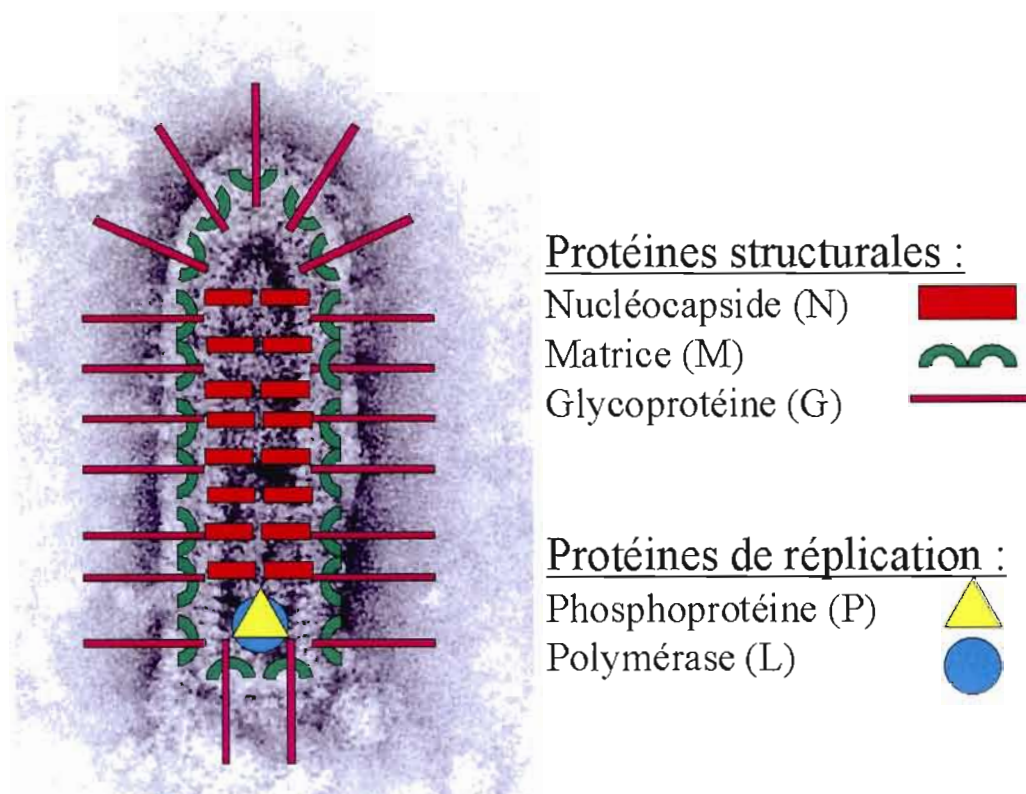


Figure 1. Structure du virion du virus de la Stomatite Vésiculeuse. La position des protéines a été déterminée à partir d'une micrographie électronique du virion en coloration négative (les formes et couleurs des protéines correspondent à celles de la figure 2).

## 1.2 Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV)

### 1.2.1 Épidémiologie

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est le prototype du genre *Vesiculovirus* de la famille des *Rhabdoviridae*. Plusieurs membres de ce genre, dont le VSV, infectent les insectes piqueurs et certains de ces insectes peuvent transmettre le virus aux animaux. Citons notamment la mouche noire, la mouche des sables et le maringouin (Letchworth et al., 1999). Les souches du VSV retrouvées en Amérique sont classées en deux sérotypes, appelés New Jersey et Indiana, qui partagent environ 50% d'homologie dans la séquence en acides aminés de leur glycoprotéine respective (Gallione et Rose, 1983; Rose et

Gallione, 1981). Ces deux sérotypes sont responsables d'une infection aiguë appelée la stomatite vésiculeuse, qui se manifeste principalement chez les bovins, les chevaux et les porcs. La maladie est caractérisée par la vésiculation et l'ulcération de la cavité orale, des pieds et des mamelles et, quoique relativement inoffensifs, ces symptômes ressemblent beaucoup à ceux causés par un pathogène vétérinaire notoire des chevaux et du bétail : le virus de la fièvre aphteuse (Flanagan et al., 2001). En général, les animaux infectés par le VSV se remettent en deux semaines.

Le VSV peut aussi infecter l'humain. Un haut pourcentage de la population rurale du Panama possède un titre élevé d'anticorps dirigés contre le VSV dans leur sérum à cause d'une exposition fréquente au virus par l'intermédiaire d'animaux infectés (Tesh et al., 1969). Ce type d'infection chez l'humain est souvent asymptomatique ou provoque des symptômes grippaux semblables à une infection par le virus influenza. Toutefois, un cas d'encéphalite a été répertorié chez un enfant de trois ans infecté par le VSV sérotype Indiana (Roberts et al., 1999).

### 1.2.2 Génome

Le génome du VSV se compose d'une molécule d'ARN simple brin de polarité négative. Il est non-segmenté et mesure 11 161 nucléotides (Lawson et al., 1995). Six ARN sont transcrits directement à partir de ce génome, dont cinq ARNm coiffés et polyadénylés (N, P, M, G et L) et un ARN « leader » (figure 2). Ce dernier est codé par l'extrémité 3' du génome et il n'est pas traduit. Chaque ARNm commence avec la même séquence de cinq nucléotides : cap-AACAG, se termine avec la séquence UAUG-poly(A), et seulement deux nucléotides séparent ces signaux d'initiation et de terminaison de la transcription entre deux gènes voisins à l'intérieur du génome (Rose, 1978). La région « trailer », située à l'extrémité 5' du génome du VSV est aussi très courte.

Deux des ARNm du VSV codent pour plus d'une protéine. En effet, l'ARNm de P, comme son analogue chez les paramyxovirus, permet la production de deux protéines additionnelles à partir d'un cadre de lecture distinct : C et C', en plus d'un polypeptide d'un poids moléculaire de 7 kDa dans le même cadre de lecture que P (Spiropoulou et Nichol, 1993; Herman, 1986). Les protéines C et C', seraient produites lorsque le ribosome initie la traduction sur le second et le troisième codon AUG de l'ARNm de P (voir section 1.4.2.1.1).

L'ARNm de M code lui aussi pour au moins deux protéines additionnelles appelées M2 et M3 (Jayakar et Whitt, 2002). Comme dans le cas de C et C', ces protéines seraient produites à cause de sites d'initiation interne de la traduction. Cependant, comme les codons AUG impliqués sont situés dans le même cadre de lecture que celui de la protéine M, M2 et M3 représentent des formes de la protéine pleine longueur tronquées à l'extrémité amino-terminale. Afin de dresser

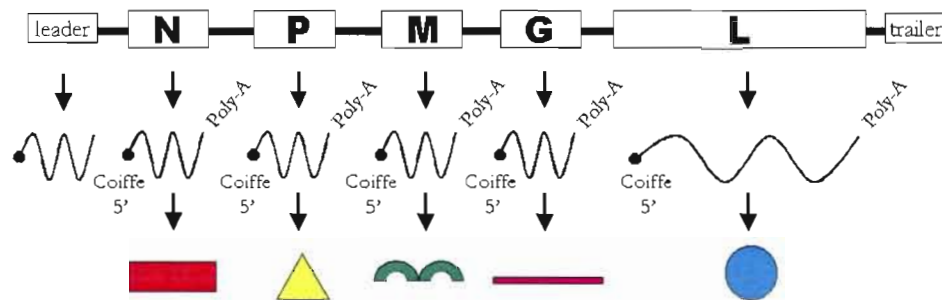


Figure 2. Représentation graphique du génome du VSV et transcrits et protéines associées à chaque gène (les formes et couleurs des protéines correspondent à celles de la figure 1).

un portrait général de la multitude de fonctions connues et attribuées à la protéine M, le cycle de réplication, la cytopathogénèse et l'immunité induite par le VSV sont décrits en détail.

### 1.2.3 Cycle de réplication et cytopathogénèse

Le cycle de réplication du VSV s'effectue entièrement dans le cytoplasme de la cellule. Suite à l'attachement de la glycoprotéine virale (G) à un ou des récepteurs cellulaires encore inconnus, le virus pénètre dans la cellule par une endocytose de type « puits de clathrine » (Matlin et al., 1982). La baisse de pH à l'intérieur de l'endosome induit un changement de conformation de G, ce qui lui permet d'opérer la fusion des membranes virale et cellulaire libérant ainsi le cœur RNP dans le cytoplasme. Il a été démontré que le phospholipide de charge négative phosphatidylsérine pouvait interagir avec la protéine G (Coll, 1997) et qu'une augmentation de sa concentration dans la membrane des cellules pouvait augmenter l'infectivité du virus. Cependant, des tests effectués avec l'annexin V permettent de conclure que la phosphatidylsérine n'est pas le récepteur cellulaire emprunté par le VSV (Coil et Miller, 2004). Le large spectre d'hôtes qui peuvent être infectés par ce virus permet toutefois de croire que son récepteur est ubiquitaire dans les cellules animales.

Une fois à l'intérieur de la cellule, la protéine M se dissocie du cœur RNP par un mécanisme encore inconnu (Rigaut et al., 1991). Ensuite, le génome est transcrit par le complexe polymérase L-P3. La protéine P ne possède aucune activité enzymatique connue, mais son état de phosphorylation semble influencer l'activité de la polymérase L. Les charges négatives additionnelles amenées par la phosphorylation de résidus sérine et thréonine dans le domaine I situé dans la portion amino-terminale de P pourraient induire un changement dans la conformation de la protéine. Cette nouvelle conformation permettrait l'oligomérisation de P en trimères qui se lieraient à L pour former la polymérase

active (Gao et al., 1996). D'autres facteurs cellulaires tels que eEF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  et -1 $\gamma$  sont aussi nécessaires à la pleine activité de la polymérase *in vitro* (Das et al., 1998).

L'unique site d'entrée de la polymérase sur le génome du VSV est situé à l'extrémité 3'. La polymérase synthétise tout d'abord un ARN « leader » de 47 nucléotides qui n'est pas coiffé ni polyadénylé, mais dont une certaine quantité est encapsidée lors du bourgeonnement (Blumberg et al., 1983). Ensuite, elle réinitie la transcription au site « start » du gène N. La synthèse de la coiffe 5' et de la queue poly-A est effectuée par la protéine L grâce à des signaux conservés au début et à la fin de chaque gène (Abraham et al., 1975; Schubert et al., 1980). Suite à la synthèse de la queue poly-A et à la terminaison de la transcription au site « stop », la polymérase doit traverser une région intergénique très conservée, avant de réinitier la transcription sur le gène suivant. L'efficacité du mécanisme de réinitiation est d'environ 70 à 80% (Iverson et Rose, 1981), ce qui se traduit en une réduction séquentielle de la transcription des gènes de 3' vers 5'. L'atténuation transcriptionnelle est une caractéristique commune des virus au génome d'ARN non-segmenté de polarité négative. Elle est probablement due au fait qu'une certaine proportion des polymérases se dissocie de la matrice génomique suite à la polyadénylation d'un transcrit ou quelque part entre l'étape de terminaison et de réinitiation de la transcription au gène situé en aval. Le résultat net de ce phénomène est un gradient de synthèse des ARNm, tel que les ARNm de N sont les plus abondants à l'intérieur des cellules infectées par le VSV, alors que les ARNm de L sont les moins abondants.

À ce stade, i.e environ 3 heures post-infection, la machinerie de traduction cellulaire est accaparée par les ARNm viraux et ce, au détriment des ARNm cellulaires. Ceci coïncide avec la déphosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E et entraîne une forte diminution de la synthèse des protéines cellulaires (Connor et Lyles, 2002). Quelques heures après, la cellule répond en inhibant complètement la traduction grâce à la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$



(voir section 1.4.1.3). Pendant ce court laps de temps, le virus produit une grande quantité de protéines qui lui permettent de compléter son cycle de réplication avant la mise en place de l'apoptose par la cellule infectée.

Lors de la réplication du génome, la polymérase du VSV doit ignorer les signaux d'initiation et de terminaison situés entre chaque gène afin de produire un brin matrice d'ARN de polarité positive. Cette matrice génomique est transcrite à son tour pour générer une grande quantité de génomes de polarité négative (Whelan et Wertz, 1999). Le mécanisme par lequel le virus passe de la transcription à la réplication est encore mal compris. Cependant, contrairement à la transcription, la réplication nécessite une traduction active, particulièrement des protéines virales N et P (Davis et Wertz, 1982).

L'assemblage et le bourgeonnement des virions sont des phénomènes dynamiques où plusieurs réactions peuvent se dérouler simultanément ou en un court laps de temps (Jayakar et al., 2004). L'assemblage débute par l'association des protéines virales N, P et L avec le génome d'ARN nouvellement synthétisé pour former le cœur RNP. Quelques molécules de M cytosoliques pourraient aussi s'associer ou former un support à ce complexe (Barge et al., 1993). Pendant ce temps, les protéines G présentes à la membrane plasmique de la cellule co-localisent pour former des sites d'environ 100-150 nm, appelés microdomaines (Brown et Lyles, 2003). Les cœurs RNP sont dirigés vers ces microdomaines et s'y condensent en structures appelées « squelettes ». Plusieurs études ont démontré que la protéine M était responsable de ces deux événements (Kaptur et al., 1991; Lyles et McKenzie, 1998; Lyles et al., 1996). En effet, l'extrémité amino-terminale de M est riche en résidus lysines. Ceci procure une charge positive à la protéine, ce qui lui permet d'interagir avec les phospholipides sur le feuillet interne de la membrane plasmique (Gaudier et al., 2002). Le fait que les microdomaines sont des régions ciblées par les cœurs RNP pourrait être expliqué par l'interaction de M et/ou de N avec la région cytoplasmique de la protéine G (Lyles et al., 1992; Chong et Rose, 1994). Cette interaction n'est pas spécifique à



la séquence du domaine cytoplasmique mais bien à sa taille (28-29 acides aminés) (Schnell et al., 1998). Ceci illustre bien la nature imprécise de l'assemblage membranaire du VSV, qui, tel que mentionné plus haut, peut incorporer d'autres protéines membranaires que G dans son enveloppe.

Les protéines G et M collaborent ensuite pour permettre le bourgeonnement des virions. En effet, l'expression isolée de chacune de ces deux protéines dans des cellules provoque l'exocytose spontanée de vésicules (Rolls et al., 1994; Justice et al., 1995). Cependant, la production d'une souche recombinante de VSV, auquel il manque le gène codant pour G ( $\Delta G$ ) a permis de démontrer que cette protéine n'était pas essentielle au bourgeonnement (Mebatsion et al., 1999). Les cellules infectées par VSV- $\Delta G$  produisent toutefois 10 fois moins de virus (Robinson et Whitt, 2000). Ceci indique que G n'est pas essentielle pour l'assemblage et la production de virus de morphologie normale, mais qu'elle contribue à l'efficacité du bourgeonnement de ces derniers.

La dernière étape, qui consiste en la scission de la membrane plasmique afin de libérer le virion dans le milieu extracellulaire, est elle aussi dirigée par la protéine M. Ceci est rendu possible grâce à l'interaction d'un motif PY, situé dans la portion amino-terminale de M entre les acides aminés 23 et 28, avec le motif WW de certaines ubiquitines ligases cellulaires. Il a été démontré que M pouvait être multi-ubiquitiné par Rsp5, l'homologue de Nedd4 chez la levure (Harty et al., 2001). Il est à noter que la protéine Nedd4 joue un rôle dans l'endocytose et est retrouvée exclusivement dans le cytoplasme de la cellule (Anan et al., 1998). De plus, cette protéine cellulaire est impliquée dans le bourgeonnement d'autres virus enveloppés (retrovirus, filovirus).

Le motif PY de la protéine M de VSV est inclus dans une partie de la protéine appelée le domaine *late*. Ce domaine est très semblable à celui de la protéine M du virus Ebola car en plus du motif PY, il contient aussi un motif

PT/SAP connu pour interagir avec les protéines cellulaires TSG101, VPS4 et ESCRT-I. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez Ebola, le motif PT/SAP n'influence pas l'efficacité du bourgeonnement du VSV *in vitro* (Irie et al., 2004).

En plus de provoquer une inhibition marquée de la traduction, le VSV induit plusieurs changements à l'intérieur des cellules qu'il infecte. L'inhibition de la transcription, l'inhibition du transport nucléo-cytoplasmique, l'arrondissement cellulaire et l'induction de l'apoptose sont tous des phénomènes dans lesquels la protéine M joue un rôle prépondérant, et seront donc discutés en détail dans la section 1.4.1.

### 1.3 Immunités induites par le VSV

#### 1.3.1 L'immunité innée

L'immunité innée permet aux cellules de réagir rapidement à une infection virale et met en jeu plusieurs facteurs cellulaires dont la protéine kinase dépendante de l'ARN double-brin (PKR) et le système interférons (IFNs). Cette première ligne de défense contre les pathogènes ralentit leur répllication et laisse le temps à l'immunité adaptative de développer une réponse à anticorps (cellules B) et à médiation cellulaire (cellules T), adaptées au type d'infection. Cette synergie entre l'immunité innée et adaptative se manifeste clairement lors de l'infection par le VSV de souris « knock-out » pour différents facteurs immunitaires impliqués dans l'une ou l'autre de ces réponses.

L'infection intranasale de souris PKR  $-/-$  par le VSV, provoque la mort rapide des animaux, et ce à des doses très faibles par rapport au contrôle (Stojdl et al., 2000). Ceci démontre le caractère essentiel et non-redondant de cette protéine dans la défense anti-virale de l'hôte. PKR est une sérine/thréonine kinase qui s'autophosphoryle suite à l'interaction avec de l'ARN double-brin, et qui cause

ensuite une inhibition de la traduction (voir section 1.4.1.3). Cette inhibition ralentit la prolifération virale pour permettre la mise en place d'autres composantes de l'immunité innée, tel que le système IFNs et subséquemment des composantes adaptatives, tel que la production d'anticorps neutralisants (Balachandran et al., 2000).

Le système IFNs est une composante critique de l'immunité antivirale innée et comprend toute une famille de cytokines produites en réponse à l'infection et qui agissent en induisant l'expression d'une multitude de gènes cellulaires, dont PKR et une protéine du pore nucléaire Nup98. Certains de ces produits peuvent agir de manière autocrine et paracrine afin d'induire un état antiviral chez la cellule. Lorsque des composantes de ce système, tel que STAT1 ou le récepteur IFN (IFNAR), sont absentes, les souris deviennent hautement sensibles à une infection létale induite par le VSV (Muller et al., 1994), et ce, même si le système immunitaire adaptatif est pleinement fonctionnel. Toutefois, tout comme PKR, le système interféron à lui seul n'est pas suffisant pour éradiquer l'infection par le VSV et son rôle est essentiellement de ralentir le processus jusqu'à l'arrivée des composantes de la réponse adaptative.

### 1.3.2 L'immunité adaptative

Dans les modèles animaux, tel que la souris, l'infection initiale par le VSV provoque la production d'anticorps neutralisants environ sept jours après l'exposition. Ces anticorps sont principalement dirigés contre les protéines G et N (Thomsen et al., 1997), même si la neutralisation de la glycoprotéine est l'élément clé de l'éradication de la maladie (Ochsenbein et al., 1999). La réponse à médiation cellulaire des lymphocytes T cytotoxiques semble, elle aussi, dirigée contre les antigènes des protéines G et N présentés par les CMH de classe I des cellules infectées.

Tel que mentionné précédemment, les animaux dont certaines composantes du système immunitaire inné, tel que PKR ou IFNs, sont déficients, vont mourir rapidement d'une infection par le VSV, très probablement due à la nature cytopathique du virus. Ceci fait en sorte que la réponse immunitaire adaptative n'a pas le temps de se mettre en place. Parallèlement, les souris ne possédant pas de cellules B, mais ayant un système IFN fonctionnel, meurent en 9 jours d'une encéphalite induite par le VSV, vraisemblablement à cause de l'absence d'anticorps neutralisants. Aussi, les souris déficientes en cellules T succombent d'une infection par le VSV après 30 jours (Thomsen et al., 1997). Ces résultats montrent bien la collaboration séquentielle des différentes composantes des systèmes immunitaires inné et adaptatif lors de la réponse à une infection virale.

### 1.3.3 Persistance

L'apparition d'encéphalites chez des souris infectées par le VSV a amené notre équipe de recherche à explorer la capacité de ce virus à persister dans des lignées cellulaires *in vitro*. En 2001, Desforges et al., ont démontré la capacité d'une souche du VSV possédant une mutation sur sa protéine M (M51R) à persister dans une lignée cellulaire neuronale humaine. Ce variant est appelé T1026-R1 et il semble que sa capacité à persister soit due à une induction plus lente de l'apoptose à l'intérieur de la majorité des types cellulaires infectés. La persistance virale étant associée à des maladies dégénératives du système nerveux central tel que la sclérose en plaque, une grande précaution devrait être apportée à l'utilisation du VSV pour des applications cliniques.

### 1.3.4 Applications cliniques du VSV

Les particularités de la réponse immunitaires au VSV permettent d'envisager l'utilisation de ce virus pour des applications cliniques tel que l'oncolyse et la vaccination. L'intérêt d'employer le VSV dans la lutte contre le

cancer repose sur son tropisme naturel vers les cellules transformées. Ceci est dû à certaines particularités de ces cellules qui les rendent plus susceptibles à l'infection par un virus comparativement à des cellules normales. Dans le cas du VSV, il semble que cette susceptibilité serait due à l'incapacité d'une grande proportion des cellules transformées à répondre à l'interféron (Stojdl et al., 2003). Ceci est démontré lorsque des cellules normales traitées à l'interféron deviennent hautement résistantes à l'infection par le VSV alors que les cellules transformées sont beaucoup moins protégées par ce traitement (Balachandran et Barber, 2000; Stojdl et al., 2000). Aussi, il a été récemment suggéré que des altérations du système traductionnel, communément retrouvées dans les cellules transformées, pourraient contribuer à leur susceptibilité au VSV (Barber, 2005).

Plusieurs autres équipes travaillent à produire des vaccins à partir de souches du VSV modifiées ou atténuées, exprimant des antigènes provenant d'autres virus (HIV, Ebola, Influenza, Hépatite C, *Respiratory Syncytial* et *Measles* virus). Ces différentes souches, lorsqu'administrées dans des modèles animaux par voie mucosale, ont permis d'immuniser les cobayes et de les protéger contre une infection subséquente (Rose et al., 2000, Kahn et al., 2001, Ezelle et al., 2002, Schlereth et al., 2000, Roberts et al., 1998, Garbutt et al., 2004).

#### 1.4 La protéine de la matrice (M) du VSV

La protéine de la matrice (M) du VSV est la plus petite et la plus abondante protéine du virion (tableau 1). Elle fait le lien entre le cœur RNP et l'enveloppe virale en interagissant directement avec les protéines N et G. Elle se compose de 229 acides aminés (figure 9-B) et n'est pas glycosylée. Une fraction du pool de protéine M est phosphorylée *in vivo* (Beckes et Perrault, 1992), mais cette phosphorylation n'est pas essentielle à l'assemblage des particules virales (Kaptur et al., 1995).

À l'intérieur des cellules infectées, environ 10 à 20% du pool de protéines M nouvellement synthétisées se retrouvent associées avec le feuillet interne de la membrane plasmique alors que la majorité se retrouve dans le cytoplasme et à l'intérieur du noyau (Lyles et al., 1988; Ye et al., 1994; Glodowski et al., 2002).

En plus de son rôle central dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions, M est en grande partie responsable des effets cytopathiques observés sur la cellule lors d'une infection par le VSV. Les portions de la protéine impliquées dans ces deux principales fonctions sont séparables (Lyles et Mckenzie, 1997) et l'existence de formes plus courtes de M pourrait expliquer en partie sa multifonctionnalité (Jayakar et Whitt, 2002; Rosen et al., 1983).

#### 1.4.1 Les changements cellulaires induits par la protéine M

##### 1.4.1.1 L'inhibition de la transcription

Afin d'observer l'effet de la protéine M sur la transcription cellulaire en l'absence d'autres facteurs viraux, de l'ARNm de M, transcrit *in vitro*, a été transfecté à l'intérieur de cellules en compagnie de différents plasmides contenant un gène rapporteur sous le contrôle des promoteurs spécifiques aux ARN polymérases I, II et III (Ahmed et Lyles, 1998). De façon générale, l'expression des gènes rapporteurs était réduite en présence de protéines M, et ce, pour les trois types de promoteurs. Dans un des deux cas impliquant l'ARN polymérase III, la transcription de l'ARNr 5S a été stimulée par M, ce qui indique que son inhibition de la transcription par l'ARN polymérase III est dépendante du promoteur.

Dans le cas de l'ARN polymérase II, l'inhibition de la transcription est due à l'inactivation du facteur TBP (TATA-binding protein), une sous-unité du facteur de transcription général TFIID. L'équipe de Lyles a toutefois montré que l'ajout de protéines M à des extraits nucléaires de cellules non-infectées n'avait aucun effet sur la transcription par l'ARN polymérase II (Yuan et al., 2001). Cette

inactivation serait donc effectuée de façon indirecte par la protéine M et impliquerait d'autres facteurs cellulaires.

Il est à noter que les variants du VSV possédant une mutation sur leur protéine M (M51R) sont défectifs dans leur fonction d'inhibition de la transcription cellulaire (Ferran et al., 1997; Coulon et al., 1990) et dans leur fonction d'inhibition du transport nucléocytoplasmique (Petersen et al., 2000). Il semble donc qu'il pourrait exister un lien entre ces deux fonctions d'inhibition par la protéine M.

#### 1.4.1.2 L'inhibition du transport nucléo-cytoplasmique

La protéine M, grâce à un ou des signaux complexes de localisation nucléaire (NLS), peut être importée de manière active à l'intérieur du noyau même si sa taille (27 kDa) lui permet aussi une diffusion passive à travers les pores nucléaires. Les pores nucléaires sont constitués d'environ 30 protéines formant un complexe de 60 000 kDa, appelé le NPC (Cronshaw et al., 2002). Ils sont perméables aux petites molécules comme l'eau, les ions, les nucléotides et les petites protéines, mais forment une barrière efficace pour les macromolécules comme les protéines, l'ARN et l'ADN. Normalement, le transport de ces macromolécules vers l'intérieur ou l'extérieur du noyau est régulé par différentes voies impliquant des facteurs capables d'interagir avec le NPC. Ces voies de transport nucléaire sont hautement spécifiques à certaines classes de molécules, consomment de l'énergie et leur activité peut être modulée par des signaux cellulaires ou des virus (Fontoura et al., 2005).

Généralement, pour pénétrer à l'intérieur du noyau, les protéines contenant un NLS interagissent avec des protéines de transport appelées karyophérines, telles que Kaps, les importines, les exportines ou les transportines. Une petite GTPase, appelée Ran, joue aussi un rôle central dans l'association et la dissociation de ces complexes de transport. La voie empruntée par la protéine M

de VSV pour pénétrer à l'intérieur du noyau n'a cependant toujours pas été élucidée. En effet, l'existence d'au moins deux NLS à l'intérieur de la protéine M vient ajouter à la complexité du mécanisme d'importation de la protéine (Glodowski et al., 2002). Le NLS-N est situé entre les acides aminés 23 et 57 et le NLS-C entre les acides aminés 47 et 229. Dans le second cas, la présence des deux extrémités de la protéine est nécessaire puisque les protéines M tronquées ne possédant que les acides aminés 47 à 194 et 57 à 229, ne sont pas importées à l'intérieur du noyau. Il est à noter que la protéine M tronquée ne possédant que les acides aminés 47 à 229 peut non seulement être activement importée à l'intérieur du noyau, mais est suffisante pour bloquer le transport nucléocytoplasmique des ARNm cellulaires.

Une fois à l'intérieur du noyau, M interagit directement avec une ou plusieurs composante(s) du NPC afin d'inhiber le transport nucléocytoplasmique (Petersen et al., 2000). Cette inhibition empêche la sortie des ARNm cellulaires du noyau vers le cytoplasme (Her et al., 1997; Stojdl et al., 2003). Deux des facteurs cellulaires impliqués sont la nucléoporine 98 (Nup98) et Rae1 (von Kobbe et al., 2000; Faria et al., 2005). Il a été récemment démontré que M pouvait former un complexe avec Rae1 (Powers et al., 1997). Cette protéine interagit directement avec Nup98, qui elle est reconnue comme étant impliquée dans l'export des ARNm cellulaires. Lorsque l'expression de Rae1 ou de Nup98 est augmentée, entre autre lors de la réponse à l'interféron, l'inhibition du transport nucléocytoplasmique par M est levée.

Rappelons qu'une mutation à la position 51 de la protéine M (M51R) rend le virus inapte à bloquer le transport nucléocytoplasmique. Comme cette mutation n'affecte pas la localisation nucléaire de la protéine M, la méthionine en position 51 pourrait permettre l'interaction avec Rae1.



### 1.4.1.3 L'inhibition de la traduction

L'inhibition de la traduction dans les cellules infectées par le VSV se fait en deux étapes successives. Tout d'abord, peu de temps après le début de l'infection, le virus bloque la traduction des ARNm cellulaires au profit de la traduction de ses propres ARNm. Cette inhibition coïncide avec l'altération du complexe d'initiation eIF-4F (Connor et Lyles, 2002). Ce complexe multiprotéique est formé par la protéine eIF-4E, qui se lie à la coiffe 5' des ARNm, la protéine structurale eIF-4G, l'hélicase eIF-4A, la kinase MNK-1 et d'autres protéines (Gingras et al., 1999). En se liant à la coiffe 5' des ARNm, eIF-4F permet la liaison avec le complexe ribosomal 40S. L'altération du complexe est indiquée par la déphosphorylation de eIF-4E. Plusieurs mécanismes semblent contribuer à cette déphosphorylation, incluant l'activation de la protéine eIF-4E-BP1/PHAS1 qui, en se liant à eIF-4E, entraîne sa dissociation de eIF-4F. Ce mécanisme empêche donc l'initiation de la traduction en inhibant le recrutement du complexe 40S à la coiffe 5' de l'ARNm. Le modèle suggéré par Connor et Lyles (2005) propose que la traduction des ARNm viraux ne soit peu ou pas affectée par l'altération du facteur d'initiation eIF-4F.

Dans un second temps, la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$  empêche la traduction de tous les ARNm, viraux et cellulaires. EIF-2 $\alpha$  est une sous-unité de eIF-2, un complexe tri-protéique responsable du recrutement de l'ARNt-met initiateur à la petite sous-unité ribosomale (40S) de manière GTP-dépendante (voir section 1.4.2.1). Lorsque eIF-2 $\alpha$  est phosphorylé, la fonction d'échange de GDP pour GTP est inhibée, ce qui bloque l'initiation de la traduction. Plusieurs kinases cellulaires possèdent la capacité de phosphoryler eIF-2 $\alpha$  (Harding et al., 2000). Toutefois, des travaux impliquant l'infection de souris PKR (-/-), montrent clairement l'importance de cette kinase cellulaire dans la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  lors de l'infection par le VSV (Stojdl et al., 2000). D'autres résultats ont démontré l'implication de la kinase du réticulum endoplasmique du pancréas (PERK) dans ce phénomène (Baltzis et al., 2004).

La cinétique de phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 $\alpha$  est importante pour la réplication virale. Comme cette phosphorylation se produit relativement tard dans l'infection, il est possible qu'un facteur viral agisse pour retarder ce phénomène d'inhibition de la traduction et ainsi allouer plus de temps au virus pour se répliquer. Contrairement à la souche sauvage, un variant du VSV possédant une mutation dans sa protéine M (M51R) est incapable de retarder la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  (Conor et Lyles, 2005). De plus, la transfection directe d'ARNm codant pour la protéine M sauvage stimule la traduction d'ARNm co-transfectés (Black et al., 1994). Ceci laisse croire que M pourrait être impliquée directement ou indirectement dans le ralentissement du processus de phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 $\alpha$ .

#### 1.4.1.4 L'arrondissement cellulaire

Lors d'infections *in vitro* par le VSV, les cellules s'arrondissent et finissent par décoller du fond du pétri de culture. Cet arrondissement cellulaire semble être dû à une désorganisation du cytosquelette. La protéine M en l'absence d'autres facteurs viraux peut provoquer ce phénomène (Blondel et al., 1990) et il a été démontré qu'elle peut interagir directement avec une protéine du cytosquelette : la tubuline (Melki et al., 1994). Cette interaction pourrait empêcher la polymérisation des microtubules. Toutefois, l'arrondissement cellulaire requiert la désorganisation de plusieurs éléments du cytosquelette ainsi que la perte d'adhésion de la cellule à son substrat. Il est donc peu probable que cette interaction, à elle seule, soit la cause du phénomène observé.

La capacité de M à induire l'apoptose en l'absence d'autres facteurs viraux pourrait aussi contribuer à la capacité qu'a cette protéine d'induire l'arrondissement cellulaire (Kopecky et al., 2001). En effet, l'induction de l'apoptose cause la désorganisation complète du cytosquelette et la perte d'adhésion au substrat des cellules. De plus, l'arrondissement cellulaire causé par

la protéine M peut être retardé lorsque les cellules surexpriment le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Kopecky et Lyles, 2003). Ceci indique que les voies apoptotiques induites en aval du facteur Bcl-2 sont nécessaires à l'arrondissement cellulaire causé par M.

#### 1.4.1.5 L'apoptose

La protéine M, en l'absence d'autres facteurs viraux, peut induire l'apoptose (Kopecky et al., 2001). Ce phénomène a été observé lors de transfections d'ARNm de M, produits *in vitro*. L'événement déclencheur pourrait être relié à une de ses fonctions d'inhibition de l'expression des gènes de l'hôte (inhibition de la transcription et inhibition du transport nucléocytoplasmique). Une autre possibilité est que M pourrait induire l'apoptose en altérant d'autres fonctions cellulaires, telle que l'organisation du cytosquelette, ou que M possède une fonction d'induction de l'apoptose, indépendante de ses autres effets cytopathiques sur la cellule.

Plusieurs travaux ont tenté d'identifier laquelle des deux grandes voies d'induction de l'apoptose, intrinsèque ou extrinsèque, était activée par VSV. La majorité des résultats semblent impliquer la voie intrinsèque par l'intermédiaire des facteurs caspase 9, Bcl-2 et Bax et ce, indépendamment de la protéine cellulaire pro-apoptotique p53. En effet, il a été démontré que la surexpression de Bcl-2 à l'intérieur de cellules HeLa provoque un délai dans l'induction de l'apoptose par M (Kopecky et al., 2003). Bcl-2 est un agent anti-apoptotique qui empêche la protéine Bax d'être relocalisée à la mitochondrie, un événement tardif de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Cet événement catalyse l'activation de plusieurs cystéines protéases (caspases) qui par la suite enclenchent de façon irréversible l'apoptose.

Les variants du VSV possédant la mutation M51R sur leur protéine M semblent plutôt emprunter la voie extrinsèque pour induire l'apoptose chez les

cellules qu'ils infectent. En effet, des tests effectués avec un inhibiteur de la caspase 8 ont permis d'induire un retard dans l'induction de l'apoptose chez des cellules L929 infectées par l'un de ces mutants (Gaddy et Lyles, 2005). Cette caspase est principalement activée par l'intermédiaire de récepteurs de mort cellulaire situés à la surface de la cellule, tel que le récepteur Fas. Il semble donc que la voie d'induction de l'apoptose qu'emprunte la souche sauvage du VSV est distincte de celle empruntée par les mutants de la protéine M (M51R).

#### 1.4.2 Les formes plus courtes de M

Les virus ont développé plusieurs stratégies afin de maximiser la capacité codante de leurs petits génomes. Cette augmentation peut se produire au niveau transcriptionnel par un « processing » des ARNm tel que l'épissage alternatif qui permet la production de plusieurs ARNm différents à partir d'un même gène (jamais observé chez le VSV); au niveau traductionnel, où des protéines peuvent être produites à partir d'un cadre de lecture différent sur l'ARNm ou grâce à l'initiation de la traduction à un ou des codon(s) d'initiation situé(s) en aval du codon AUG principal; ou directement au niveau protéique lorsque le produit d'un clivage protéolytique possède une ou des fonctions différentes de la protéine initiale; d'où l'appellation de « processing » protéolytique (voir section 1.4.2.2) (Cattaneo et al., 1989; Curran et Kolakofsky, 1990; Pager et Dutch, 2005; Lopez-Otin et Overall, 2002).

Jayakar et Whitt ont montré en 2002 que l'ARNm de la protéine M pouvait coder pour au moins deux protéines additionnelles. Ces protéines sont produites à partir du même cadre de lecture que M grâce à des sites d'initiation interne de la traduction en position 33 et 51, et partagent donc la même séquence d'acides aminés carboxy-terminale (figure 9-B). Ces formes plus courtes de M sont appelées M2 et M3 et leur poids moléculaire est évalué à 24 et 21 kDa, respectivement. Ces protéines ne sont pas essentielles pour l'assemblage et le bourgeonnement et sont présentes en très petite quantité à l'intérieur du virion.

Par contre, elles pourraient être impliquées dans l'induction de certains effets cytopathiques, tel que l'arrondissement cellulaire (Jayakar et Whitt, 2002). En effet, en ajoutant un gène codant exclusivement pour M2 et M3 à un variant du VSV incapable de causer l'arrondissement cellulaire à cause de mutations sur sa protéine M rendant entre autres impossible la production de ces formes plus courtes (M33,51A, T133A et S226G), il est possible de lui redonner un phénotype d'infection normal.

Il est à noter que la production de protéines M à l'aide de systèmes d'expression *in vitro* ne permet pas d'obtenir les formes M2 et M3. Il est possible que la machinerie de traduction cellulaire soit altérée par un autre facteur viral que M lors de l'infection et que ces modifications induisent un balayage défectueux des ribosomes, ce qui pourrait provoquer l'apparition du phénomène d'initiation interne de la traduction. Une autre possibilité est que les formes plus courtes de M observées lors de l'infection de cellules soient produites par un autre mécanisme.

Une autre forme plus courte de la protéine M a été identifiée lors de l'infection de cellules BHK-21 (Rosen et al., 1983). Il semble que cette protéine, d'environ 17,5 kDa, soit produite par protéolyse. La protéase impliquée n'a toutefois pas été identifiée.

#### 1.4.2.1 L'initiation interne de la traduction

L'amorçage de la traduction chez les cellules eucaryotes implique plus de dix facteurs cellulaires désignés eIF (pour *eucaryotic initiation factor*). Les facteurs eIF-1A et eIF-3 s'attachent à la petite sous-unité (40S) du ribosome et eIF-2 (chargé de GTP) s'associe à un ARNt-met pour rejoindre l'élément 40S. Ce complexe entre sur l'ARNm à son extrémité 5' grâce aux facteurs eIF-4F, eIF-4A et eIF-4B qui sont déjà liés à la coiffe 5' de l'ARNm par l'intermédiaire de eIF-4E (un protomère de eIF-4F). La présence d'une coiffe 7-méthyl-guanosine (7mG) à cette extrémité augmente fortement la traduction. Ensuite, le complexe 40S-

ARNt-met migre de façon linéaire sur la portion non-codante de l'ARNm, appelée UTR (pour *untranslated region*), jusqu'à ce qu'il rencontre le premier codon d'initiation de la traduction (AUG) où il s'arrête. Ce phénomène est appelé le balayage du ribosome. L'arrêt du balayage est attribuable à l'appariement du codon AUG avec l'anticodon de l'élément ARNt-met. À cet endroit, le facteur eIF-5 active l'hydrolyse du GTP par eIF-2, ce qui libère tous les facteurs d'initiation (eIF) et permet à la grosse sous-unité ribosomale (60S) de se fixer à l'élément 40S pour former le complexe ribosomal 80S. Ce dernier peut finalement débiter la traduction de l'ARNm. Il est à noter qu'en contrôlant le taux d'hydrolyse de GTP, eIF5 contrôle la fiabilité du mécanisme d'initiation de la traduction (Huang et al., 1997).

Même si le modèle prédit que la traduction devrait toujours s'initier sur le codon AUG situé le plus près de l'extrémité 5' de l'ARNm, deux mécanismes – la réinitiation et l'initiation interne – permettent d'autres événements d'initiation à des codons AUG situés plus en aval chez certains ARNm. La réinitiation se produit sur des ARNm possédant de courtes portions codantes à leur extrémité 5' (Alderete et al., 2001; Gaba et al., 2001). Dans certains cas, suite à la production d'un petit peptide, la grosse sous-unité ribosomale se dissocierait pour permettre à la petite sous-unité de recommencer à balayer l'ARNm à partir du site de terminaison de la traduction. Ceci permettrait donc l'initiation de la traduction à un site situé en aval du premier (pour une revue complète voir Kozak, 2002).

L'initiation interne de la traduction peut être due à un balayage défectueux du ribosome ou encore à la présence de sites d'entrée interne pour le ribosome (IRES). Les IRES sont des séquences de 200-300 nucléotides que possèdent certains ARNm viraux et cellulaires. Ils permettent l'entrée directe du ribosome près d'un site d'initiation de la traduction sans que celui-ci n'ait à passer par l'extrémité 5' (pour une revue complète voir Pisarev et al., 2005).

L'efficacité du mécanisme d'initiation à un codon AUG donné dépend entre autre du contexte dans lequel il se situe, i.e. la séquence nucléotidique l'entourant. Chez les mammifères, le contexte optimal pour la reconnaissance d'un site d'initiation de la traduction par un ribosome est GCCRCCaugG. La purine située en position -3 est la plus conservée et la plus importante au niveau fonctionnel. L'importance d'un A ou d'un G en position -3 (A étant meilleur que G) a été démontrée sur une grande variété de gènes par des expériences de mutagenèse (Kozak, 1986). Le G en position +4 est aussi très conservé et contribue fortement à l'efficacité de l'initiation de la traduction, spécialement en l'absence de A en position -3. Des variations dans le reste du motif optimal n'ont que peu de conséquences lorsque les nucléotides aux positions -3 et +4 sont conformes. Toutefois, en l'absence de ces éléments, le motif GCC peut contribuer (Kozak, 1987).

Lorsque le codon d'initiation de la traduction qui est situé le plus près de l'extrémité 5' de l'ARNm n'est pas dans un contexte optimal, il arrive que le ribosome glisse et initie la traduction sur le ou les AUG suivants. Ce phénomène est appelé « balayage défectueux du ribosome » et tout comme la réinitiation, il permet la production de plus d'une protéine à partir d'un même ARNm. La structure secondaire d'un ARNm peut aussi influencer l'initiation de la traduction. En effet, la présence de séquences « leader » riches en GC pourrait ralentir le balayage du ribosome et lui permettre d'initier la traduction sur des codons AUG situés dans des contextes sub-optimaux. La présence de ces séquences riches en GC pourrait aussi expliquer un phénomène rarement observé : l'initiation de la traduction à des codons autres que AUG tel que ACG ou CUG (Kiefer et al., 1994; Riechmann et al., 1999).

Les trois premiers codons d'initiation de la traduction de l'ARNm de la protéine M de VSV sont situés dans le même cadre de lecture. De plus, ils possèdent tous trois une purine en position -3, ce qui les place dans un excellent contexte pour l'initiation de la traduction. Toutefois, le premier codon AUG à



partir de l'extrémité 5' de l'ARNm ne possède pas le G en position +4, ce qui pourrait entraîner un balayage défectueux du ribosome et permettre l'initiation de la traduction sur le second codon AUG. Ce dernier possède un A en position -3 et un G position +4. Ceci représente un contexte optimal et, selon le modèle de Kozak, il serait étonnant que le ribosome puisse glisser sur cette séquence pour initier la traduction sur le troisième codon AUG de l'ARNm de M.

Tableau II. Contexte entourant les trois premiers codons d'initiation de la traduction à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm de la protéine M du VSV.

Position du codon AUG	Contexte
1er	...UUC <u>A</u> UCaug <u>A</u> ...
2ième	...ACU <u>A</u> ACaug <u>G</u> ...
3ième	...GAC <u>G</u> AGaug <u>G</u> ...
optimal	GCC <u>R</u> CCaug <u>G</u>

#### 1.4.2.1.1 Autres cas connus de protéines virales produites par initiation interne de la traduction : VSV (P) et Sendai (P)

L'ARNm de la phosphoprotéine (P) du VSV code pour deux protéines additionnelles à partir d'un cadre de lecture distinct (Spiropoulou et Nichol, 1993). Ces deux protéines, baptisées C et C' sont hautement basiques et comportent respectivement 55 et 65 acides aminés chez VSV sérotype New Jersey et 55 et 67 acides aminés chez VSV sérotype Indiana. Quoique le potentiel de produire ces petites protéines à partir de la région 5' de l'ARNm de P est hautement conservé chez les vésiculovirus, leur fonction demeure nébuleuse. Il a été suggéré qu'elles pourraient être impliquées dans la transmission du virus par les insectes et même si ces dernières ne sont pas essentielles à la croissance de VSV in vitro, leur implication dans la transcription et la réplication du génome viral demeure controversée (Kretzschmar et al., 1995; Peluso et al., 1996).



L'existence de ces petites protéines est due au phénomène d'initiation interne de la traduction. Malgré le fait que le codon AUG permettant la production de la protéine P soit situé en première position à partir de l'extrémité 5' de l'ARNm et qu'il soit dans une forte séquence de Kozak (GAUAUCaugG), une certaine proportion des ribosomes glissent pour amorcer la traduction sur le second (C') ou le troisième (C) codon d'initiation. Cette exception à la règle pourrait être due au fait que le premier codon d'initiation est situé très près de l'extrémité 5'. En effet le UTR de l'ARNm de P n'est long que de 10 nucléotides, ce qui pourrait expliquer le tendance des ribosomes à glisser vers le suivant (Kozak, 2002). Aussi, la quantité plus importante de protéines C par rapport à C' suggère que l'initiation de la traduction se fasse plus fréquemment sur le troisième codon d'initiation que sur le second. Ce phénomène peut toutefois être expliqué par le contexte entourant les codons AUG, alors que le troisième (CCAAUUaugA) est dans un bien meilleur contexte que le second (AGAUAGaugA).

Le virus Sendai, de la famille des *Paramyxoviridae*, peut lui aussi produire plus d'une protéine à partir de l'ARNm de sa phosphoprotéine. Il est intéressant de noter que la plus petite protéine codée par cet ARNm, Y2, est capable à elle seule, à la fois de contrer l'action des interférons et d'inhiber la synthèse des ARN viraux (Kato et al., 2001).

#### 1.4.2.2 Le «processing» protéolytique

Le «processing» protéolytique est un phénomène de protéolyse distinct de la dégradation dans la mesure où il représente le clivage hautement spécifique de certains substrats, ce qui résulte en un changement spécifique de fonction pour la protéine impliquée (Lopez-Otin et Overall, 2002). Ce mécanisme est bien caractérisé chez les virus produisant une seule polyprotéine à partir d'un ARNm unique, tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et plusieurs autres

rétrovirus. Cette polyprotéine est clivée par la protéase virale en de multiples protéines indépendantes et possédant chacune leurs fonctions propres.

Très peu de cas existent dans la littérature où une protéine virale, clivée par une protéase cellulaire, se voit modifiée de telle sorte que sa fonction change. Toutefois, certaines glycoprotéines virales, telles que celles des virus influenza et Sendai, doivent subir ce genre de modification afin d'être activée et de pouvoir effectuer la fusion des membranes virale et cellulaire (Kido et al., 2003; Kido et al., 1999).

### 1.5 Induction de l'apoptose sur les lignées cellulaires HeLa, BHK-21 et L929 par le VSV

Différentes caractéristiques peuvent rendre une certaine lignée cellulaire plus ou moins sensible à l'infection par un virus. Tout d'abord, pour qu'une infection virale puisse avoir lieu, la cellule doit être permissive. Ceci implique la présence à la surface de la cellule du récepteur emprunté par le virus et l'existence de la machinerie cellulaire nécessaire à sa réplication à l'intérieur du cytoplasme et/ou du noyau. Jusqu'à présent, toutes les lignées cellulaires animales testées se sont avérées permissives à une infection par le VSV.

Cependant, la rapidité avec laquelle le VSV induit l'apoptose varie d'une lignée cellulaire à l'autre. Citons le cas des cellules HeLa, qui, lorsqu'infectées par une souche sauvage du VSV, meurent toutes par apoptose à l'intérieur des 24 premières heures de l'infection. Lorsque ces mêmes cellules sont infectées par un variant possédant la mutation M51R sur sa protéine M, l'induction de l'apoptose est retardée. Il semble donc que la protéine M sauvage vient accélérer la mise en place du processus apoptotique à l'intérieur des cellules HeLa. Le phénomène inverse est observé lorsque des cellules BHK-21 sont infectées par le VSV sauvage ou mutant. Dans ce cas, la présence de protéine M sauvage retarde l'induction de l'apoptose, de telle sorte qu'une infection par le mutant (M51R)

induit l'apoptose plus rapidement. Comme l'expression isolée de la protéine M mutante (M51R) ne suffit pas à induire l'apoptose, il semble qu'un autre facteur viral soit impliqué dans ce phénomène et que la protéine M sauvage vienne retarder la mise en place du processus apoptotique à l'intérieur des cellules BHK-21 (Kopecky et al., 2001). Ce même retard d'induction de l'apoptose par le VSV en présence de la protéine M sauvage a été observé chez d'autres lignées cellulaires telles que les cellules murines L929 (Gaddy et Lyles, 2005).

Il a été suggéré que les observations décrites ci-haut pourraient être dues à la nécessité, pour les cellules BHK-21, de produire certains facteurs *de novo*, contrairement aux cellules HeLa, pour pouvoir enclencher le processus apoptotique (Kopecky et Lyles, 2003). Rappelons tout d'abord que la protéine M, lorsqu'exprimée en l'absence d'autres facteurs viraux bloque l'expression des gènes de l'hôte (Black et al., 1993), alors que la mutation M51R vient annuler cette fonction. Ce blocage semble être à l'origine de l'induction de l'apoptose chez les cellules HeLa où cette induction ne nécessiterait pas la synthèse de facteurs *de novo*.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Cellules et culture cellulaire

Les cellules épithéliales humaines HeLa et les fibroblastes de hamster : BHK-21 et de souris : L929 (hygro) poussent en monocouches au fond de pétris de plastique (Sarstedt, Montréal, Québec). Elles ont été cultivées dans un milieu MEM (*minimum essential medium*), 10% (v/v) sérum de veau (SV) et 1% (v/v) antibiotiques (concentrations finales de 100 U/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine; Gibco BRL, Burlington, Ontario) à 37°C dans une atmosphère humide, composée à 5% de CO<sub>2</sub>. La souche cellulaire L929 (hygro) utilisée ici contient un plasmide lui conférant une résistance à l'antibiotique hygromycine B.

#### 2.2 Souches virales

La souche virale HR (heat resistant) est dérivée du virus de la stomatite vésiculeuse (San Juan) sérotype Indiana. Cette souche virale est connue pour inhiber rapidement l'expression de gènes de l'hôte (PSI+, pour *protein synthesis inhibitor*) ce qui bloque la réponse à l'interféron de la cellule. T1026-R1 (T : Toronto; R : thermorevertant) est un mutant spontané provenant de la souche HR dont la seule mutation se situe sur la protéine M à l'acide aminé 51 (M51R). Cette seule mutation rend ce mutant incapable d'inhiber l'expression des gènes de la cellule hôte (PSI-). Le variants T1026-R1 a été isolé grâce à sa capacité à induire l'expression d'IFNβ à l'intérieur des cellules infectées (Stanners et al., 1977; Francoeur et al., 1987). La mutation thermosensible révertée touchait la polymérase virale L.

### 2.3 Infection

Les cellules ont étéensemencées dans des pétris de 60 mm ou de 100 mm la veille de l'infection, de manière à atteindre une confluence d'environ 80% le jour de l'infection ( $2 \times 10^6$  cellules/pétri de 60 mm et  $6 \times 10^6$  cellules/pétri de 100 mm). Le milieu de culture MEM complet (10% (v/v) SV, 1% (v/v) pen/strep) a été retiré et le virus, préalablement dilué dans du PBS (« phosphate buffered saline ») contenant 2% de sérum de veau (v/v), a été déposé sur les cellules dans un volume minimal, soit 300  $\mu$ L dans un pétri de 60 mm ou 1000  $\mu$ L dans un pétris de 100 mm. Toutes les infections ont été effectuées à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 10. Le temps d'adsorption a été de 45 minutes à l'incubateur (37°C, atmosphère 5% CO<sub>2</sub>). Par la suite, un volume adéquat de milieu MEM complet a été ajouté, soit 2 mL dans un pétri de 60 mm ou 5 mL dans un pétri de 100 mm. Les cellules infectées ont été gardées à 37°C, dans une atmosphère 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à la récolte.

### 2.4 Marquage radioactif

Lors du marquage radioactif des cellules infectées, le milieu MEM complet fut d'abord retiré, puis immédiatement remplacé par un milieu MEM exempt de méthionine et de cystéine (Sigma, Oakville, Ontario) auquel a été préalablement ajouté 50  $\mu$ Ci/mL de met/cys marqué au <sup>35</sup>S (proMix redivue, Amersham Biosciences, >1200 Ci/mmol) en plus de 10% (v/v) SV et 1% (v/v) pen/strep. Le temps de marquage a été de une heure puis le milieu radioactif fut retiré. Finalement, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS et un volume adéquat de milieu MEM complet fut ajouté. Les échantillons cellulaires furent soit récoltés sur le champ, soit remis à l'incubateur pour la chasse. Cette technique a permis de suivre l'évolution des protéines marquées. Pour les échantillons traités au z-VAD (Enzyme Systems, Livermore, CA), les cellules ont été mises en présence de cet inhibiteur pan-caspases dilué dans du DMSO à une concentration

finale de 0,1 mM une demi-heure avant le début de l'infection et ce, jusqu'à la récolte.

## 2.5 Récolte et lyse des cellules

Lors de la récolte, le surnageant cellulaire contenant les cellules déjà décollées du fond du pétri a été transféré dans un tube de 15 mL (Sarstedt) contenant 5 mL de PBS à 0  C. Ce tube a été déposé sur glace. Les cellules adhérentes ont été lavées une fois avec 1 mL de PBS (0  C) puis, grattées du fond du pétri. Ce dernier a été ensuite rincé une fois avec du PBS (0  C). Les cellules et les liquides de rinçage ont été déposés dans le même tube de 15 mL qui contenait le surnageant. Les tubes furent centrifugés 5 minutes à 600 x g . Les culots cellulaires ont été lavés une fois avec 5 mL de PBS (0  C), puis conservés à -20  C.

La lyse cellulaire fut effectuées à l'aide d'un tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% (p/v) deoxycholate, 0,1% (p/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) contenant du fluorure de phényl méthyl sulfonyl (PMSF) 1 mM ou un inhibiteur de protéases complet (Complete mini EDTA-free, Roche, Laval, Qc, composé d'un mélange d'inhibiteurs de sérine- et cystéine-protéases). Les culots cellulaires ont donc été resuspendus dans ce tampon, puis laissés 10 minutes sur glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 10 000 X g et les surnageants furent transférés dans un autre tube stérile en vue du dosage protéique. Ce dernier a été effectué selon une adaptation de la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) (DC protein assay, Bio-Rad, Montréal, Qc).

## 2.6 Immunoprécipitation

Lors de l'immunoprécipitation, 100   g de protéines provenant d'extraits cellulaires infectés ont été déposés dans un tube 5 mL à ultra-centrifugeuse (polycarbonate). Le volume total a été complété à 800   L avec le tampon

d'immunoprécipitation A (1% (p/v) Triton, 0,02% (p/v)  $\text{NaN}_3$ , 20 mM L-méthionine, 0,1% (p/v) BSA, 1mM PMSF dans du PBS), puis les tubes ont été centrifugés 45 minutes à 300 000 x g. Le surnageant a été transféré dans un tube eppendorf (1,5 mL) auquel furent ajoutés 400  $\mu\text{L}$  d'une solution NaCl 4M et le premier anticorps (50  $\mu\text{L}$  du sérum polyclonal anti-VSV non-dilué ou 4  $\mu\text{L}$  du monoclonal anti-M (liquide d'ascite 23H12 non-dilué). Les tubes ont été fixés sur un agitateur rotatif, incubés 2 heures à température pièce puis, toute une nuit au réfrigérateur (4°C). Le lendemain, 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension 50% de protéine A-sépharose (CL-4B, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc) dans le tampon d'immunoprécipitation A, fut ajouté à chaque tube et l'incubation s'est poursuivie 2 heures à température pièce. Les billes de protéine A furent ensuite lavées 3 fois avec le tampon d'immunoprécipitation B (1% (p/v) Triton, 0,02% (p/v)  $\text{NaN}_3$ , 1mM PMSF dans du PBS) puis une fois avec du PBS. Les protéines virales et les anticorps ont finalement été détachées des billes de protéine A sépharose à l'aide du tampon de Laemmli (2% (v/v) SDS, 10% (v/v) Glycérol, 60 mM Tris et 0,01% (w/v) bleu de bromophénol) avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 12%. Après la migration (90 minutes à 120V), les gels ont été séchés, puis exposés 48h dans une cassette de type phosphorimager.

## 2.7 Purification de l'anticorps monoclonal anti-M (23H12) à partir du surnageant des hybridomes.

Les hybridomes 23H12 produisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine M du VSV ont été fournis par le Dr. Douglas Lyles (Lefrancois et Lyles, 1982). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu sans sérum (Sigma) afin d'éviter la contamination par d'autres anticorps lors de la purification. Les cellules ont été amenées à une confluence de 100% dans des pétris de 100 mm, puis le milieu de culture a été récupéré. Les anticorps contenus dans ce milieu ont été purifiés par incubation en tube sur billes Prosep A ou Prosep G selon les directives du fabricant (Millipore, Canada). L'efficacité de ces deux supports s'est révélée être comparable pour la purification de l'anticorps 23H12.

## 2.8 Purification de la protéine M en vue de l'analyse par spectrométrie de masse et du séquençage de l'extrémité amino-terminale par la méthode de dégradation de Edman

Lors des expériences d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal anti-M (23H12) et le polyclonal anti-VSV, il a été observé que les formes plus courtes de la protéine M du VSV co-migraient avec la chaîne légère des anticorps dans un gel de polyacrylamide de 12% (SDS-PAGE) (Figure 4). Afin d'éviter la contamination par la chaîne légère lors de l'analyse des séquences par dégradation de Edman et par spectrométrie de masse, les anticorps ont été fixés à des billes de protéines A-sépharose de manière covalente à l'aide d'une solution de diméthylpimélimidate (DMP) (Podlaski et Stern, 2000). La protéine M du virus HR a été purifiée avec l'anticorps monoclonal anti-M (23H12), tandis que la protéine M du mutant T1026-R1 l'a été avec l'anticorps polyclonal anti-VSV. La purification des protéines virales à partir de 3 à 6 mg de protéines totales provenant des échantillons cellulaires infectés a été effectuée tel que décrit dans la section immunoprécipitation, sauf l'étape de l'élution des protéines purifiées qui a été effectuée à l'aide d'un tampon Tris-HCl pH 2.5 au lieu du tampon de Laemmli. Les protéines ont par la suite été concentrées sur membrane par centrifugation (Amicon Ultra, « molecular weight cut-off»: 10,000 Da, Millipore).

Pour l'analyse par spectrométrie de masse, les protéines éluées ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%) puis, chacune des bandes dont le poids moléculaire correspondait à M et ses formes plus courtes a été analysée séparément par l'équipe de Génome Québec (Montréal, Qc) selon la méthode de spectrométrie de masse LC-QToF.

Pour le séquençage de l'extrémité amino-terminale par la méthode de Edman, suite à leur séparation par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%), les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-



P, Millipore). La bande d'intérêt a été analysée par l'équipe de Sheldon Biotechnologies (Montréal, Qc) selon la méthode de dégradation de Edman.

## 2.9 Immunobuvardage

Les immunobuvardages visant à détecter la protéine M et ses formes plus courtes ont été effectués avec l'anticorps monoclonal anti-M purifié à partir du milieu de culture des hybridomes 23H12 (voir section 2.7). Pour ce test, les protéines (10 µg) provenant des échantillons cellulaires infectés ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE (12%), puis transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Les membrane ainsi obtenues ont ensuite été incubées toute une nuit dans une solution de blocage (0,1% (v/v) Tween-20 et 5% (p/v) lait en poudre dans du PBS). Par la suite, les membranes ont été lavées deux fois avec du PBS-T (0,1% (v/v) Tween-20 dans du PBS), puis incubées en présence de l'anticorps monoclonal anti-M (23H12) à une dilution de 1/10 000 dans le PBS-T. Après une série de 3 lavages, une autre incubation est effectuée avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la HRP (« Horse radish Peroxydase ») (Amersham Biosciences) utilisé à une dilution de 1/10 000 dans le PBS-T. Suite à une autre série de 3 lavages, l'immunodétection fut réalisée par chemiluminescence grâce à la trousse ECL-Plus (Amersham Biosciences).

## 2.10 Test de dégradation de M par la caspase 3

Pour ce test, les protéines M sauvage et mutante (M51R) provenant de l'isolat Orsay du sérotype Indiana du VSV ont été produites grâce au système d'expression bactérien pET-21d (Novagen, Mississauga, Ontario), puis purifiées grâce à la présence d'une queue histidine en fusion avec M. 10 µg de protéines ont été déposées dans un tampon de réaction (50 mM Hepes, pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.1% (p/v) Chaps, 10 mM EDTA, 5% (p/v) Glycérol et 10 mM DTT) contenant une unité (1U) de l'enzyme caspase 3 active (Active Recombinant Human

Caspase-3, BioVision, Lyon, France), puis incubées à 37°C pour des temps variant entre 0 et 90 minutes. La dégradation de M a été vérifiée par immunobuvardage avec l'anticorps monoclonal anti-M (23H12).

### 2.11 Construction des vecteurs PL6 (amplification par PCR des gènes M2, M3 et M2 (M51R))

Les gènes codant pour les protéines M2 et M3 sauvages (Jayakar et Whitt, 2002) et M2 (M51R), ont été amplifiés par PCR à partir des gènes complets de M sauvage et mutant (M51R) préalablement clonés dans un vecteur pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA). Les amorces de l'extrémité 3' utilisées pour ces amplifications (BioCorp, Montréal, Qc) peuvent s'hybrider à l'intérieur du gène codant pour la protéine M pleine longueur (position correspondant à l'acide aminé 33 pour les amorces M2 et M2 (M51R) et 51 pour l'amorce M3). Chaque gène a ensuite été introduit séparément, dans l'orientation 3'-5', à l'intérieur du vecteur inductible pL<sub>6</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF2-PL à l'intérieur du site de clonage en position *eco*-*R1/cia-1*. L'inducteur d'expression est un analogue de la rapamycine (AP21967) et est utilisé à des concentrations variant entre 50 et 500 nM. Les constructions ont été séquencées (Génome Québec, Montréal) afin de s'assurer de la séquence et de la bonne orientation des inserts. Ces vecteurs permettent l'expression isolée de protéines correspondant aux produits de l'initiation interne de la traduction aux acides aminés 33 et 51 de l'ARNm de la protéine M.

Tableau III. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes M2 et M3.

Nom de l'amorce	Séquence*
VSV (M2) 5' EcoRI	<b>c</b> <u>gtagaattc</u> <b>g</b> <u>atggagtatgctccgagcgct</u>
VSV (M3) 5' EcoRI	<b>c</b> <u>gtagaattc</u> <b>g</b> <u>atggacactcatgatccgcat</u>
VSV (M) 3' ClaI**	<b>c</b> <u>gttatcgattc</u> <b>atttgaagtggctgacagaa</b>

\* en gras : séquences de reconnaissance par les enzymes des restriction EcoRI ou ClaI  
souligné : séquences complémentaires au gène M

\*\* la même amorce sera utilisée pour l'extrémité 3' des deux gènes

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

L'objectif de la présente étude était de déterminer de quelle façon les formes plus courtes de la protéine M du VSV sont produites lors de l'infection de cellules *in vitro* et de découvrir leur rôle physiologique.

#### 3.1 Identification des formes plus courtes de M par immunobuvardage

Afin d'observer le patron sur gel des formes plus courtes de la protéine M du VSV, des immunobuvardages avec un anticorps monoclonal dirigé contre M (23H12) ont été effectués sur des extraits protéiques totaux provenant de cellules infectées par une souche sauvage du VSV (HR) (figure 3). Dans le cadre de ce test, le contenu en protéines M de cellules HeLa et BHK-21 infectées a été comparé à des temps post-infection variant entre 5 et 12 heures.

Les formes plus courtes de M produites durant l'infection présentent une chronologie d'apparition très différente lorsqu'on compare ces deux lignées cellulaires. Lorsqu'infectées par une souche sauvage du VSV (HR), les cellules HeLa se mettent rapidement à produire une grande quantité de protéines M pleine longueur, ici appelée M1. Dès 5 heures après le début de l'infection, il est aussi possible d'observer un doublet sous la bande représentant M1 (figure 3-A), alors que la bande correspondante n'apparaît qu'à 10 hpi chez les cellules BHK-21 (figure 3-B). Ce doublet sera appelé ici M'. Une autre bande (M'') apparaît sous le doublet à 6 hpi chez les cellules HeLa, et à 8 hpi chez les cellules BHK-21. La protéine M'' apparaît donc avant M' chez les cellules BHK-21 alors que l'inverse est observé chez les cellules HeLa. Finalement, la forme la plus courte (Mfc) apparaît à 8 hpi, chez les HeLa, et à 12 hpi chez les BHK-21.

### 3.2 Analyse de la dégradation de M par des tests de type « pulse-chase »

Dans le but de caractériser plus spécifiquement le moment de synthèse et la relation possible précurseur/produit des différentes formes de M, des cellules HeLa, BHK-21 et L929 ont d'abord été infectées par la souche sauvage du VSV (HR), ou par un variant (T1026-R1) qui possède la mutation M51R sur sa protéine M. Elles ont ensuite subi un marquage radioactif ( $[^{35}\text{S}]$ -Met/Cys) d'une heure à différents temps post-infection avant d'être récoltées après des temps de chasse variables. Les protéines virales ont été purifiées des extraits totaux grâce à la méthode d'immunoprécipitation (figures 4 à 7).

Un test a d'abord été effectué sur quelques échantillons afin de déterminer la quantité et la nature de l'anticorps à utiliser pour les expériences d'immunoprécipitation subséquentes (figure 4). Ici, trois formes plus courtes de M ont pu être observées en plus de la protéine pleine longueur, et ce, indépendamment de la souche virale ou de l'anticorps employés. Les poids moléculaires de ces formes de M correspondent à ceux des protéines M1, M', M'' et Mfc observées lors des expériences d'immunobuvardage. Les autres bandes observées lors des immunoprécipitations effectuées avec l'anticorps monoclonal 23H12 semblent correspondre aux poids moléculaires des autres protéines du VSV : L, N et P. Il semble que les conditions d'extraction et de purification permettent la conservation des interactions de M avec ces protéines virales puisqu'elles co-précipitent avec l'anticorps monoclonal anti-M (figure 4-B, les 3 puits de gauche).

Les deux anticorps (monoclonal anti-M et polyclonal anti-VSV) ont permis de purifier la protéine M et ses formes plus courtes de façon comparable. Toutefois, une particularité de l'anticorps monoclonal 23H12 vient empêcher son utilisation lors d'expériences visant à comparer les souches virales HR et T1026-R1. En effet, il a été démontré que la reconnaissance de la protéine M par cet anticorps, était influencé par la nature de l'acide aminé situé en position 51

(Petersen et al., 2000). Aussi, des expériences réalisées dans notre laboratoire ont montré l'inefficacité de l'anticorps 23H12 à reconnaître la protéine M du mutant T1026-R1 (M51R) lors d'expériences d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation (résultats non-présentés).

Des tests ont aussi été effectués avec des quantités variables d'extraits protéiques totaux provenant de cellules infectées (résultats non-présentés). Ces résultats ont permis de fixer les conditions optimales d'immunoprécipitation. Les expériences subséquentes ont été effectuées avec 100 µg de protéines provenant d'extraits cellulaires totaux et les protéines virales ont été immunoprécipitées en présence l'anticorps polyclonal anti-VSV à une dilution 1/25 (50 µL d'Ac dans un volume final de 1,25 mL; voir section 2.6). La quantité de protéines obtenue à partir des extraits totaux a été dosée par une méthode dérivée de celle de Lowry (Lowry et al., 1951), puis vérifiée par coloration au bleu de coomassie des gels contenant une quantité déterminée de chaque échantillons. La constance dans la quantité d'anticorps récupérée suite aux immunoprécipitation a aussi été vérifiée par coloration au bleu de coomassie (résultats non-présentés). Il est aussi à noter que les bandes observées lors des immunoprécipitations effectuées avec l'anticorps polyclonal anti-VSV sur des extraits protéiques provenant de cellules infectées n'apparaissent pas lorsque les protéines proviennent de cellules non-infectées (figure 5, colonnes Non-infectées).

Les expériences de « pulse-chase » permettent d'observer la maturation et/ou la dégradation d'une protéine à l'intérieur d'une cellule en fonction du temps. Les tests effectués ici avaient donc comme objectif de comparer les taux de production et de dégradation des protéines M pleine longueur sauvage et mutante (M51R) ainsi que le rythme d'apparition et de dégradation des formes plus courtes à l'intérieur de différentes lignées cellulaires. Trois lignées cellulaires (HeLa, BHK-21 et L929) connues pour présenter des différences nottament dans leur rapidité à induire l'apoptose lorsqu'infectées par le VSV (voir section 1.5) ont été comparées. Les cellules ont d'abord été infectées par un des variant du VSV (HR

ou T1026-R1). Elles ont ensuite subi une période de marquage d'une heure à l'aide d'un milieu de culture contenant des acides aminés radioactifs ( $[^{35}\text{S}]$ -Met/Cys). Ici, les marquages ont été effectués à 4, 7 ou 10 hpi et les temps de chasse ont couvert une période de 0 à 4 heures.

La cinétique d'apparition de chacune des formes de M (M1, M', M'' et Mfc) au cours de l'infection varie grandement selon la lignée cellulaire et la souche virale employée. Deux expériences de « pulse-chase » indépendantes ont été effectuées. Lors du premier test (figure 5), les extraits cellulaires ont été lysés en présence de l'inhibiteur de protéases fluorure de phényl méthyl sulfonyl (PMSF) seulement alors que dans le second test (figure 6), la récolte des protéines a été effectuée en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases complet (Complete mini EDTA-free, Roche). Le PMSF est connu pour empêcher l'action des enzymes de type sérines-protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaïne, etc...) tandis que le cocktail d'inhibiteurs « Complete mini EDTA-free » est composé d'un mélange d'inhibiteurs de sérine- et cystéine-protéases. La présence d'un tel mélange réduit beaucoup les risques qu'un clivage indésirable de M puisse se produire pendant la récolte des protéines.

Lors du premier test (figure 5), lorsqu'infectées par HR, les cellules HeLa et L929 ont permis exclusivement la production des formes M1, M'' et Mfc pendant la période de marquage (figure 5-A et C, colonnes 0). Ce résultat pourrait être expliqué par le phénomène d'initiation interne de la traduction alors que le poids moléculaire de M'' ( $\approx 25$  kDa) correspond à celui de la protéine M2 décrite par Jayakar et Whitt en 2002, et que celui de Mfc ( $\approx 22$  kDa) correspond à la forme M3, rapportée par les mêmes auteurs (voir section 1.4.2). De plus, lors de l'infection de ces mêmes lignées cellulaires par la souche mutante T1026-R1, seules les formes M1 et M'' peuvent être détectées immédiatement après la période de marquage 4 à 5 hpi (figure 5-B et D, colonnes 0). L'absence de la forme Mfc à cet endroit semble logique avec l'impossibilité pour les ribosomes d'initier la traduction à la position 51 de la protéine M de T1026-R1 à cause de la

mutation M51R. Ainsi, selon cette hypothèse, M'' serait le résultat d'initiation interne de la traduction en position 33 de la protéine M, et Mfc (HR) serait le résultat d'initiation interne de la traduction en position 51. Cependant, l'apparition au cours de la chasse, de la forme Mfc, ou d'une forme de M de taille comparable à l'intérieur des cellules infectées par T1026-R1 suggère plutôt une origine protéolytique. Cette augmentation de la quantité de la forme Mfc en fonction du temps de chasse peut être observée indépendamment de la lignée cellulaire employée (figure 5). De plus, la production de Mfc semble plus efficace en fonction de la progression de l'infection, ce qui laisse croire que l'activité de la protéase responsable de ce clivage augmente au fil de l'infection (figure 7).

En ce qui concerne la forme M', les différences observées entre les résultats obtenus lors du premier et du deuxième test sont venus semer un doute quant à son origine (figure 5 vs figure 6). Ces données ouvrent la porte à ce que l'apparition de cette forme de M soit due à un clivage artéfactuel de la protéine plutôt qu'à un processing ou une néosynthèse.

L'analyse densitométrique des bandes correspondant à la protéine pleine longueur (M1) permet d'observer une diminution de plus de 50% de sa quantité totale après seulement une heure de chasse (figure 5-E, M1/10). Ceci est dû à la dégradation naturelle de la protéine M par des protéases cellulaires et au bourgeonnement des virions qui emportent avec eux une certaine proportion de protéines marquées. Cependant, l'augmentation de la quantité de protéine M1 entre 1h et 4h de chasse à l'intérieur des cellules L929 et HeLa infectées par le VSV sauvage (HR) (figure 5-E, M1/10 et figure 5-A et C, colonnes 1h et 4h) va à l'encontre de la logique pour ce test. Ceci pourrait être expliqué par une erreur de manipulation ou encore à une récupération ou une accumulation des acides aminés radioactifs à l'intérieur de ces cellules au cours de l'infection, ce qui permettrait leur réutilisation pendant la chasse. Il est à noter que ce phénomène n'a pas été observé chez les cellules BHK-21 et qu'aucun cas semblable, relié à des expériences de type « pulse-chase » n'a été rapporté à notre connaissance.



Aussi, afin de déterminer si la dégradation de M requière l'activation des caspases, l'effet d'un inhibiteur universel de ces protéases impliquées dans l'apoptose a été testé. Le pré-traitement des cellules avec un inhibiteur pan-caspase (z-VAD) semble influencer le taux de dégradation de la protéine M pleine longueur et la cinétique d'apparition des formes plus courtes (figure 5, colonnes 4 + z-VAD). En effet, la présence de z-VAD retarde la dégradation de la protéine M pleine longueur. Aussi, le z-VAD empêche la production de la forme M<sub>fc</sub> chez les cellules L929 infectées par le VSV mutant (T1026-R1) (figure 5-B, D et F). Cette inhibition semble toutefois dépendante du type cellulaire alors qu'elle n'a pu être observée chez les cellules HeLa.

Lors d'un marquage tardif (10 hpi) des cellules HeLa et BHK-21 infectées par le mutant T1026-R1, les quatre formes de M peuvent être observées, et ce, immédiatement après la période de marquage (figure 7, colonnes 0). La densité des bandes M1, M' et M'' diminue au fil de la chasse de 4 heures, sauf lors de la première heure de chasse pour les cellules HeLa. Ceci pourrait être expliqué par une différence dans la quantité de protéines chargées sur le gel avant la migration. Malgré cela, le ratio M<sub>fc</sub>/M1 augmente considérablement pendant la première heure de chasse chez les cellules HeLa (figure 7-A, histogramme). Au bout des 4 heures de chasse, les deux seules formes de M encore présentes en quantité suffisante pour être détectées par cette méthode sont la forme pleine longueur M1 et la forme la plus courte M<sub>fc</sub>, et ce chez les deux lignées cellulaires infectées.

Cette même analyse densitométrique permet d'observer une augmentation significative du ratio M<sub>fc</sub>/M1 au cours de la chasse pour les cellules BHK-21, alors que la quantité de la forme la plus courte de M s'accroît graduellement jusqu'à atteindre plus de 40% du pool résiduel de protéines M1 produites entre 10 et 11 hpi.



### 3.3 Test de dégradation de la protéine M par la caspase 3

L'effet négatif sur la dégradation de M de l'inhibiteur pan-caspase z-VAD et la présence d'un site analogue au site de reconnaissance par les caspases 2, 3 et 7 autour de l'acide aminé 51 de la protéine M (DEMD dans le cas de la séquence sauvage et DERD dans le cas de la protéine mutante M51R, voir figure 9-B) permettent de supposer un clivage par une de ces cystéines protéases (Laverdière, 2000). Le test de la figure 8 montre toutefois que la protéine M du VSV n'est pas un substrat de la caspase 3. Les protéines M sauvages et mutantes (M51R) ont été produites et purifiées à partir de systèmes d'expression bactériens pET-21d, puis mises en présence de caspase 3 active avant d'être incubées à 37°C de 0 à 90 minutes. Aucun effet n'a pu être observé sur le patron sur gel présenté par M et ses formes plus courtes lors d'une expérience d'immunobuvardage avec l'anticorps monoclonal 23H12. Il est à noter que la protéine M utilisée dans ce test provenait d'un isolat différent (Orsay) mais du même sérotype (Indiana) que celui employé dans les autres expériences. Les protéines M de ces deux isolats ne diffèrent que par 4 acides aminés (Beausoleil, 1994). La présence de formes plus courtes de M à l'intérieur des extraits purifiées à partir du système d'expression bactérien pET-21d est surprenante. Ceci pourrait être expliquée par l'existence du phénomène d'initiation interne de la traduction à l'intérieur des bactéries utilisées (BL-21). Cette hypothèse entre toutefois en contradiction avec les résultats obtenus par l'équipe de Whitt (2002) qui avaient noté l'absence de M2 et M3 à l'intérieur d'extraits protéique provenant d'un autre système d'expression bactérien. D'un autre côté, cette observation pourrait être attribuable à un phénomène de protéolyse, analogue ou pas à celui observé à l'intérieur de cellules eucaryotes, ayant lieu pendant la production ou la récolte de la protéine M.

### 3.4 Analyse de la forme Mfc du mutant T1026-R1 par la méthode de dégradation de Edman

Dans le but d'observer quelle extrémité de la protéine est manquante à l'intérieur de la forme Mfc du mutant T1026-R1, les protéines virales ont d'abord été purifiées d'un extrait total provenant de cellules infectées à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-VSV. Suite à la séparation des protéines par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et à leur transfert sur une membrane de PVDF, la bande dont le poids moléculaire correspondait à celui de la forme Mfc a été découpée puis analysée par la méthode de dégradation de Edman (figure 9). Le résultat obtenu pour Mfc (T1026-R1) montre une homologie modérée avec l'extrémité amino-terminale de la protéine M pleine longueur. Les différences observées pourraient être dues à la sensibilité de la méthode à cause de la faible quantité de protéine Mfc récupérée lors de la purification. Aussi, la protéine M du VSV est bloquée par un groupement acétyle à son extrémité amino-terminale (Lenard et Vanderoef, 1990). La présence de tels groupements interfère grandement avec la méthode de Edman. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse (voir section 3.5) a révélé que les bandes de M immunoprécipitées avec l'anticorps polyclonal anti-VSV pouvaient être contaminées par d'autres protéines virales. Cela aurait aussi eu pour effet de fausser les résultats du séquençage par dégradation de Edman.

Ce résultat semble indiquer que Mfc (T1026-R1) possède toujours son extrémité amino-terminale et que sa plus petite taille, par rapport à la protéine pleine longueur, serait due à l'absence d'une portion de la protéine à son extrémité carboxy-terminale.

### 3.5 Analyse des formes plus courtes de M par spectrométrie de masse

Dans le but d'observer quelle extrémité de la protéine est manquante à l'intérieur de chacune des formes plus courtes de M, ces dernières ont d'abord été

purifiées, puis, suite à une digestion tryptique, les fragments protéiques ont été analysés par spectrométrie de masse (figure 10). La détection de fragments de la protéine à ses deux extrémités (amino- et carboxy-terminale) chez les formes M'' et Mfc du virus sauvage (HR) n'explique pas pourquoi ces formes de M migrent aussi bas dans un gel de polyacrylamide. Cependant, lorsque M est muté en position 51 (M51R) (figure 10-B), l'extrémité amino-terminale des formes M'' et Mfc n'est plus détectable par cette méthode.

La différence de la nature des anticorps utilisés pour la purification des protéines M sauvage et mutante pourrait toutefois influencer les résultats et rendre la comparaison hasardeuse. Notons que lors de la purification des protéines virales du mutant T1026-R1 avec l'anticorps polyclonal anti-VSV, les bandes protéiques dont le poids moléculaire correspondait à celui de la protéine M et ses formes plus courtes étaient contaminées par d'autres protéines virales, notamment la phosphoprotéine P. Les phénomènes d'initiation interne de la traduction et/ou de protéolyse pourraient expliquer ces observations.

La purification de la protéine M du virus HR par l'anticorps monoclonal 23H12 a permis l'obtention de bandes protéiques pures. Les bandes du doublet M' ont été analysées séparément dans le but d'identifier la différence entre ces deux protéines. Seul un fragment tryptique situé au centre de la protéine est absent de la bande 2. Il semble toutefois très peu probable qu'un clivage ait lieu à cet endroit. De plus, la quantité de protéines purifiées était plus importante pour la bande 1 que la bande 2 et ceci pourrait avoir favorisé la détection d'un plus grand nombre de fragments tryptiques lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

### 3.6 Expression isolée des formes M2, M3 et M2 (M51R) à l'intérieur de lignées cellulaires transfectées

Afin de pouvoir observer séparément les effets sur la cellule des formes de M produites par initiation interne de la traduction, des vecteurs d'expression

inductibles, contenant les gènes codant pour ces différentes formes, ont été produits. Les gènes tronqués codant pour les protéines M2, M3 et M2 (M51R) selon la nomenclature de Jayakar et Whitt (2002), ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces pouvant s'hybrider à l'intérieur du gène codant pour la protéine M pleine longueur. Chaque gène a été introduit séparément à l'intérieur du vecteur inductible pL<sub>6</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF2-PL dans l'orientation 3'-5' afin de réduire au maximum le niveau basal d'expression des différentes formes de M par les promoteurs constitutifs contenus à l'intérieur des LTRs de ce vecteur (Boisseau, 2006). L'inducteur d'expression est un analogue de la rapamycine (AP21967). Ici, l'utilisation d'un promoteur inductible permet une expression dirigée du gène d'intérêt et empêche la protéine M du VSV d'induire ses effets cytopathiques en dehors du cadre de l'expérience. La figure 11 montre la présence des inserts à l'intérieur du fragment le plus court du vecteur pL<sub>6</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF2-PL produit à la suite d'une digestion avec l'enzyme de restriction *Dra-I*.

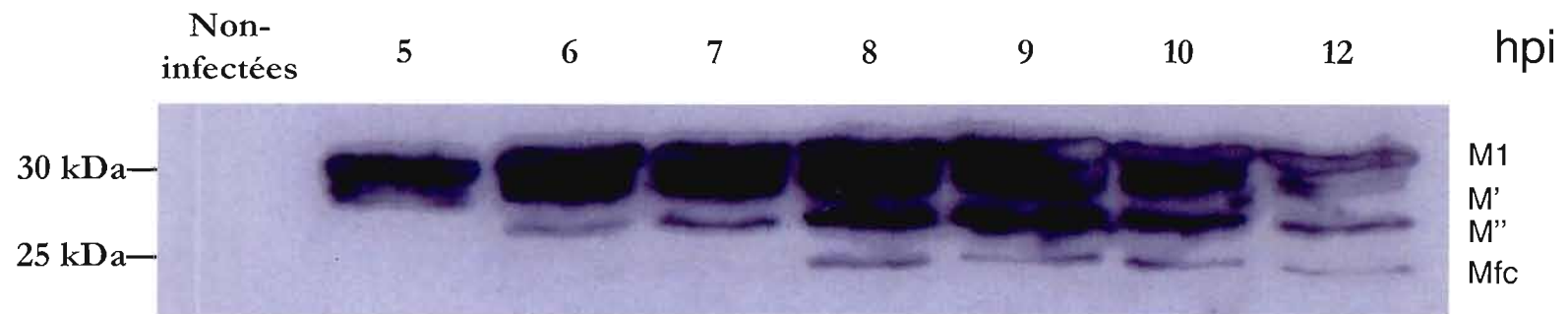
Suite à l'induction de l'expression des gènes M2, M3 et M2 (M51R) avec différentes concentrations d'inducteur à l'intérieur de lignées cellulaires HeLa transfectantes stables, les formes plus courtes de M n'ont pu être détectées lors de tests d'immunobuvardages effectués sur des extraits protéiques totaux (résultats non-présentés). De plus, des observations directes au microscope n'ont permis d'observer aucun effet direct sur la morphologie des cellules jusqu'à 48h post-induction. Il est donc impossible de faire la différence entre l'absence d'effet de ces formes de M sur la cellule ou l'absence de production de M dans les conditions de l'expérience.

Figure 3

Immunobuvardages avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine M du VSV sur des extraits protéiques provenant de cellules HeLa et BHK-21. Les cellules ont d'abord été infectées par le VSV (HR), puis récoltées à toutes les heures de 5 hpi à 10 hpi, et à 12 hpi. 10 µg d'extraits protéiques totaux ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%), puis transférés sur une membrane de PVDF. Ces membranes ont été soumises à un test de type immunobuvardage avec l'anticorps monoclonal 23H12. Les cellules non-infectées ont été récoltées 12 heures après l'infection placebo. A : cellules HeLa. B : cellules BHK-21.

A.

## Cellules HeLa



B.

## Cellules BHK-21

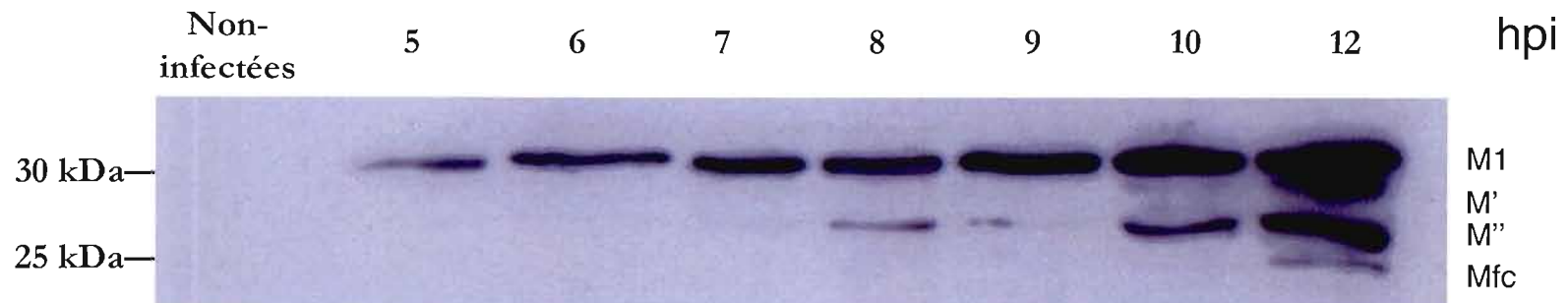


Figure 4

Mise au point des paramètres d'immunoprécipitation. 75 µg d'extraits protéiques radioactifs provenant de cellules HeLa infectées par le VSV sauvage (HR) ou le mutant T1026-R1 ont été immunoprécipités avec différentes quantités de l'anticorps monoclonal 23H12 (liquide d'ascites fourni par le Dr. Lyles, Wakeforest University, NC) ou de l'anticorps polyclonal anti-VSV. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%). A : Gels colorés au bleu de coomassie. Les bandes majeures correspondent aux poids moléculaires des chaînes lourdes et légères des anticorps utilisés lors de l'immunoprécipitation. B : Autoradiographie des gels séchés.

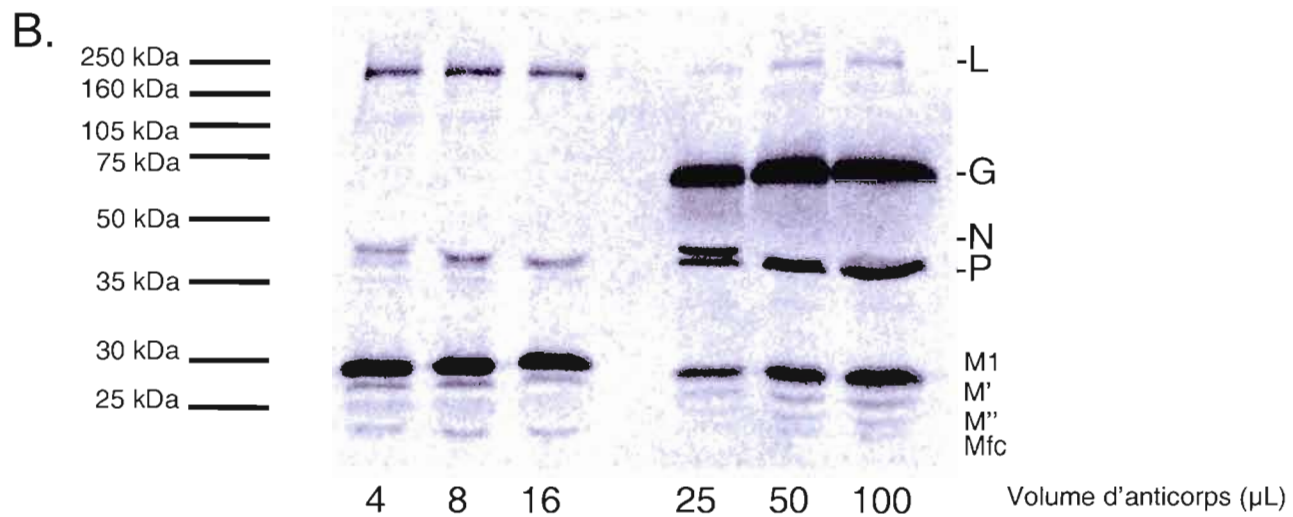
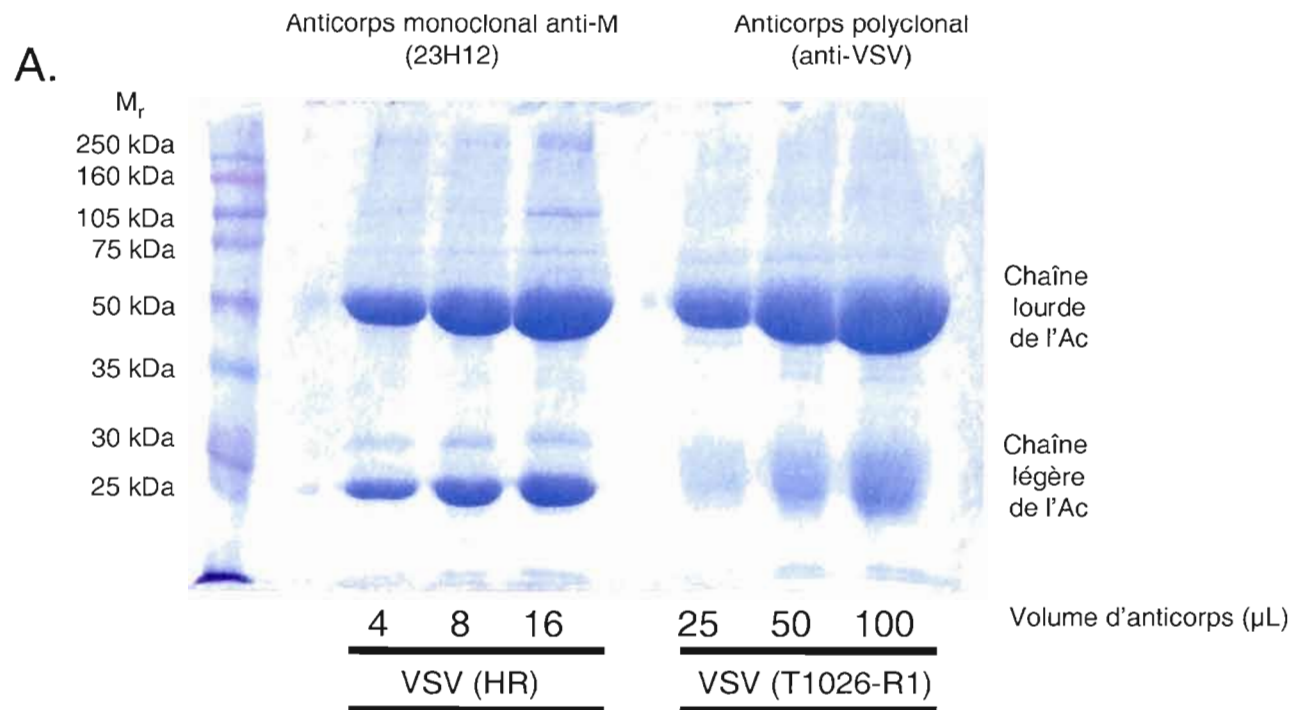
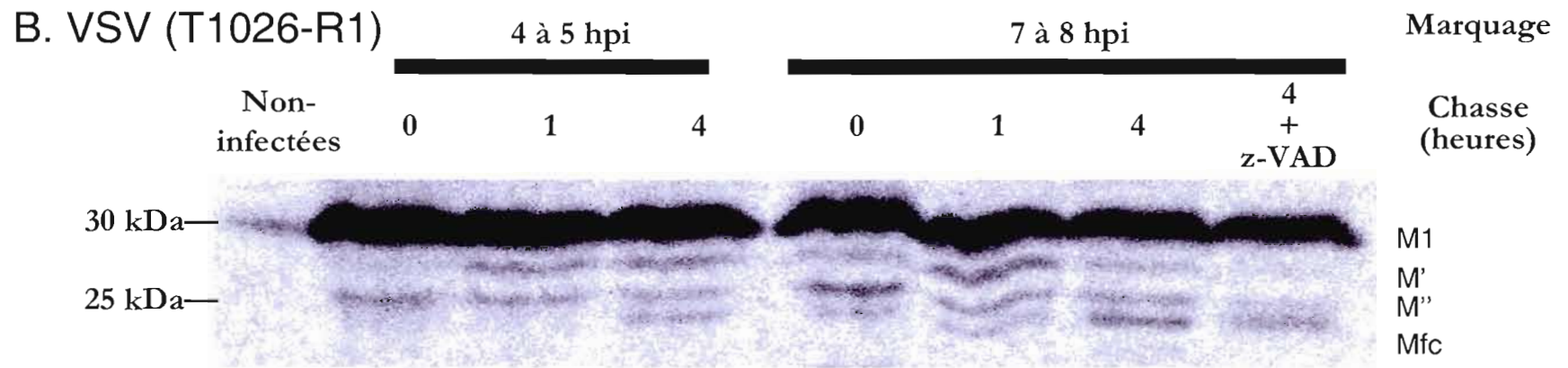
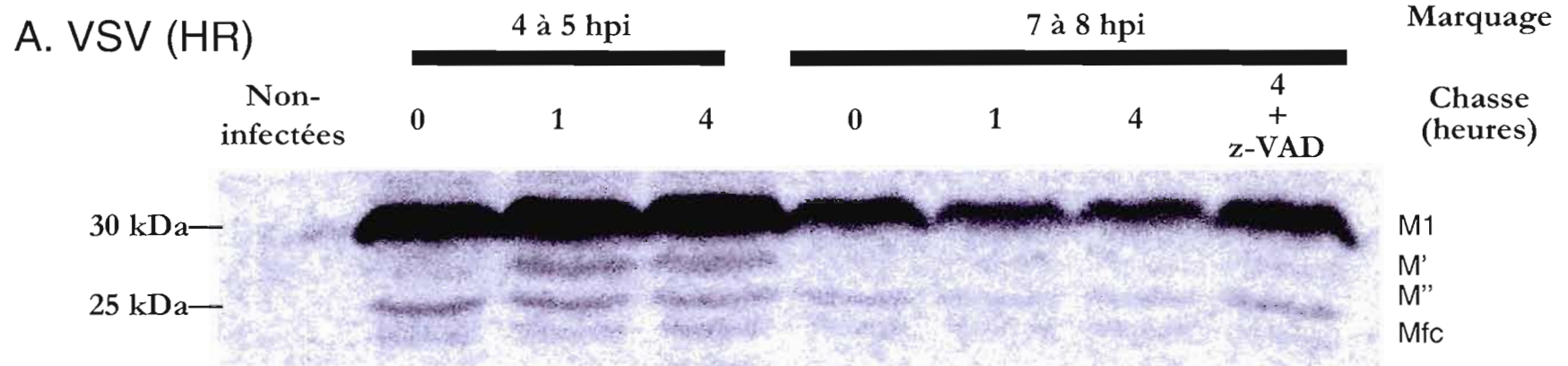




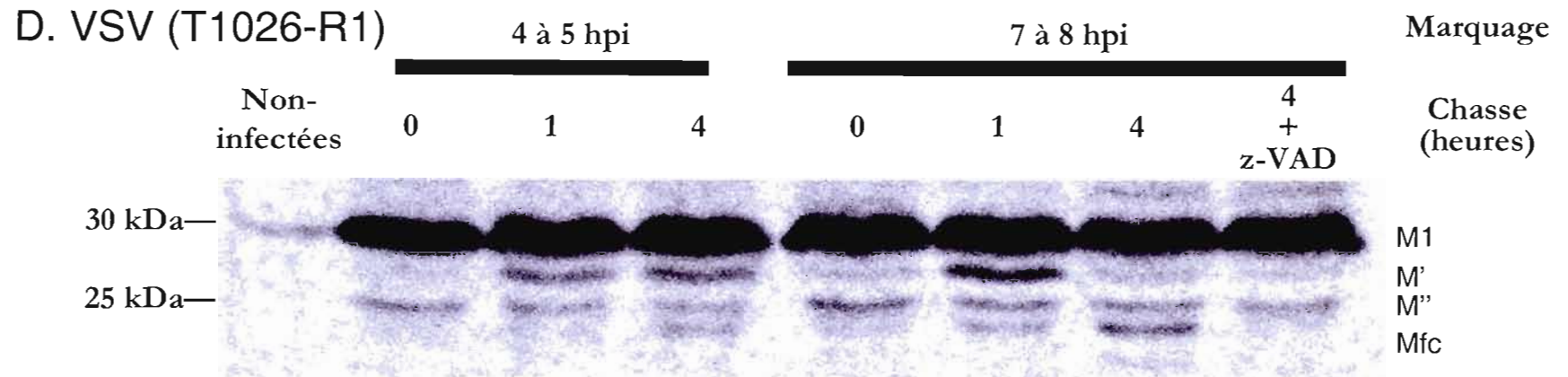
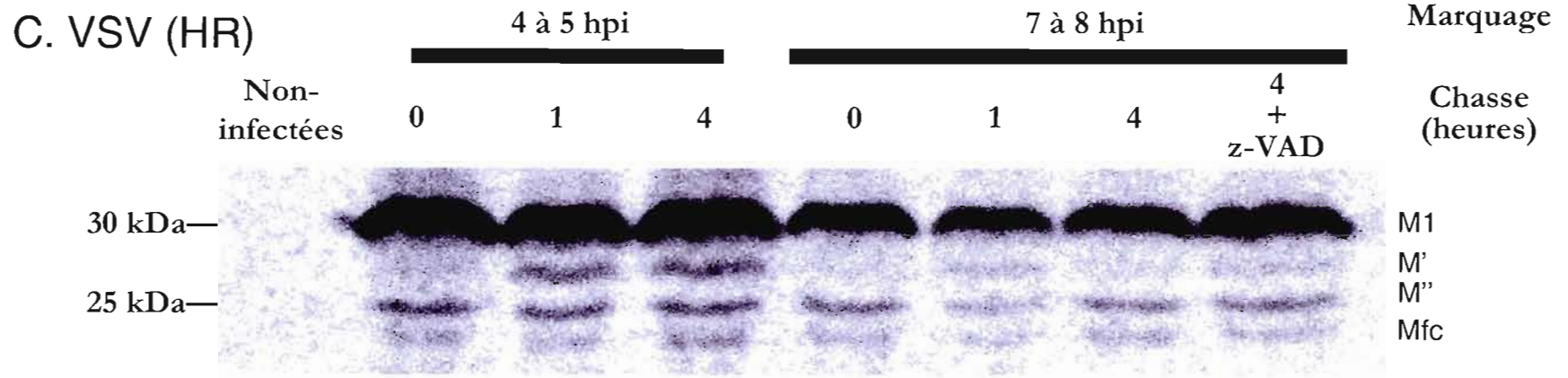
Figure 5

Expériences de type «pulse-chase» sur des cellules HeLa et L-929 infectées. À 4 ou 7 hpi, les cellules ont subi un marquage radioactif (met/cys  $^{35}\text{S}$ , 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ) d'une heure pour ensuite être récoltées à différents temps post-marquage (0, 1 et 4h). Le dernier puit de chaque gel correspond à des chasses de 4h sur des cellules ayant subi un traitement au z-VAD, un inhibiteur pan-caspases. Les protéines virales ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-VSV, séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%) puis analysées par autoradiographie. Les cellules non-infectées ont été récoltées 12 heures après l'infection placebo. A et C : Cellules infectées par le VSV (HR). B et D : Cellules infectées par le VSV (T1026-R1). E et F : Analyse densitométrique des bandes correspondant aux différentes formes de M visualisées par autoradiographie après le pulse-chase des cellules L929, marquage 7 à 8 hpi. La densité des bandes de la protéine pleine longueur M1 a été divisée par un facteur de 10 afin de rendre ces résultats comparables avec ceux des formes plus courtes (M', M'' et Mfc). E : Cellules L929 infectées par le VSV (HR). F : Cellules L929 infectées par le VSV (T1026-R1). La valeur  $\text{CNT/mm}^2$  est une mesure de densité du signal radioactif à l'intérieur d'une aire constante déterminée par l'expérimentateur. Les valeurs présentées à l'intérieur des histogrammes sont les résultats d'une seule expérience.

# Cellules HeLa



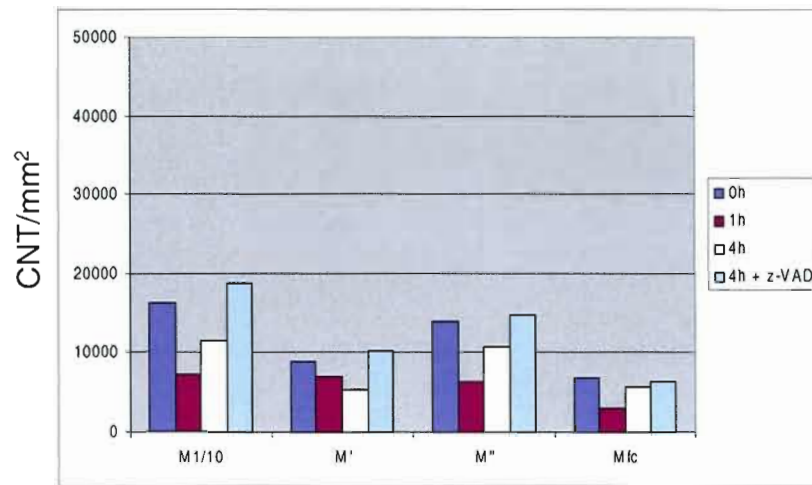
# Cellules L929



# Cellules L929

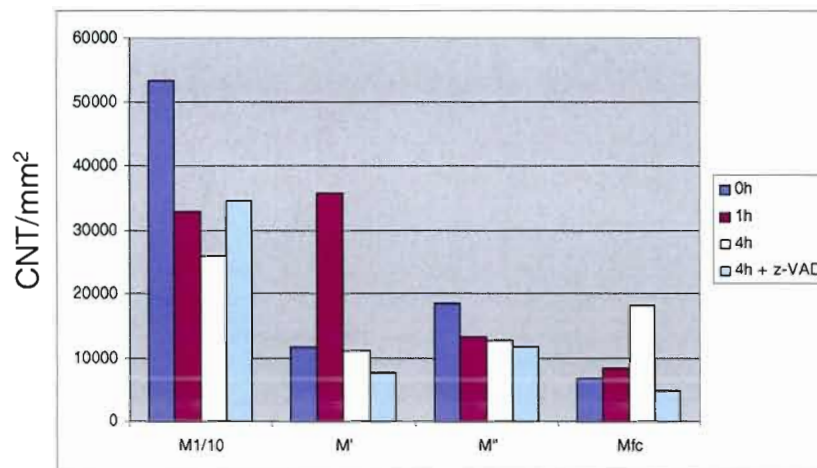
Marquage 7 à 8 hpi

## E. VSV (HR)



Temps  
de  
chasse

## F. VSV (T1026-R1)



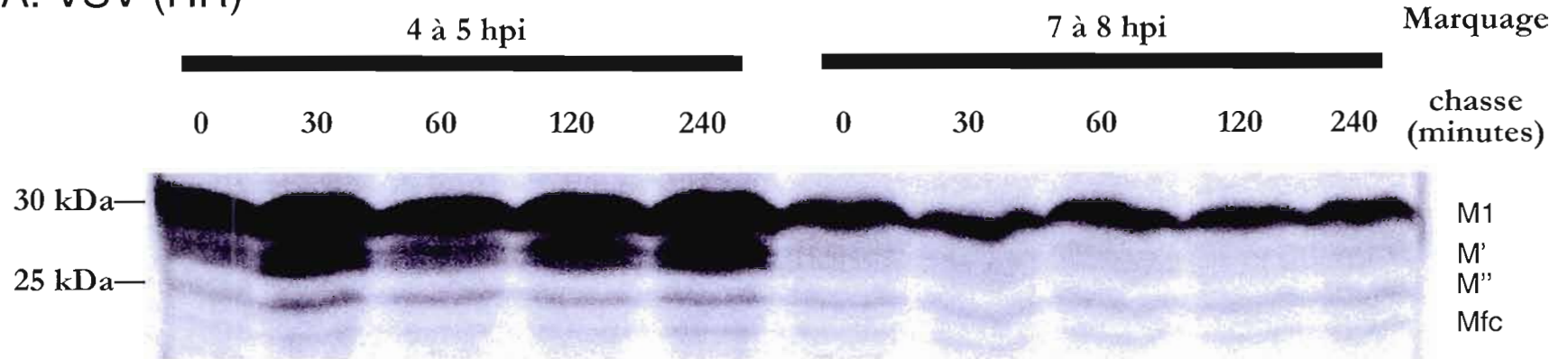
Temps  
de  
chasse

Figure 6

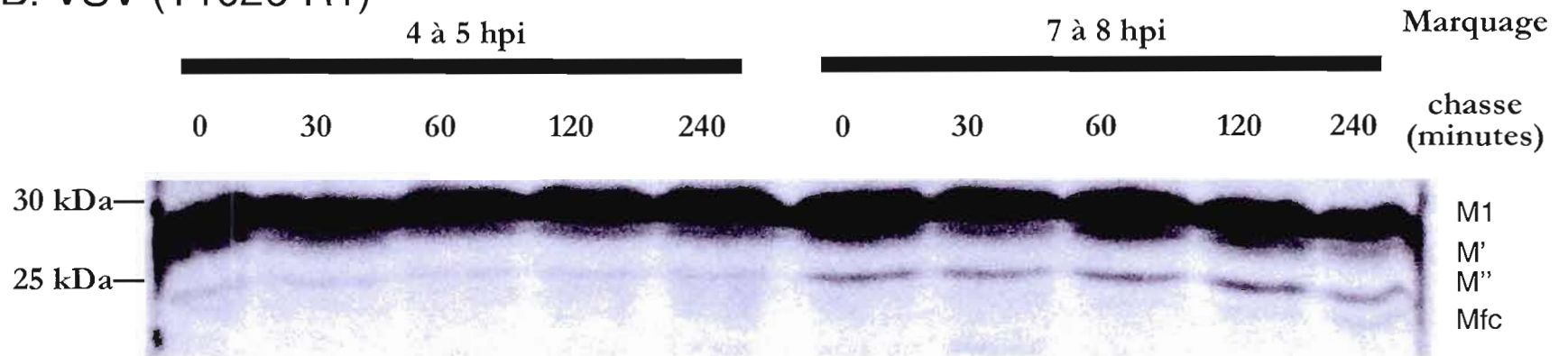
Expériences de type «pulse-chase» sur des cellules HeLa et BHK-21 infectées. À 4 ou 7 hpi, les cellules ont subi un marquage radioactif (met/cys  $^{35}\text{S}$ ,  $50\mu\text{Ci/ml}$ ) d'une heure pour ensuite être récoltées à différents temps post-marquage (0, 30, 60, 120 et 240 min). Les protéines virales ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-VSV, séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%) puis analysées par autoradiographie. Les cellules non-infectées ont été récoltées 12 heures après l'infection placebo (résultat non-présenté). A et C : Cellules infectées par le VSV (HR). B et D : Cellules infectées par le VSV (T1026-R1). E et F : Analyse densitométrique des bandes correspondant aux différentes formes de M visualisées par autoradiographie après le pulse-chase des cellules BHK-21, marquage 7 à 8 hpi. La densité des bandes de la protéine pleine longueur M1 a été divisée par un facteur de 10 afin de rendre ces résultats comparables avec ceux des formes plus courtes (M', M'' et Mfc). E : Cellules BHK-21 infectées par le VSV (HR). F : Cellules BHK-21 infectées par le VSV (T1026-R1). La valeur  $\text{CNT/mm}^2$  est une mesure de densité du signal radioactif à l'intérieur d'une aire constante déterminée par l'expérimentateur. Les valeurs présentées à l'intérieur des histogrammes sont les résultats d'une seule expérience.

# Cellules HeLa

## A. VSV (HR)



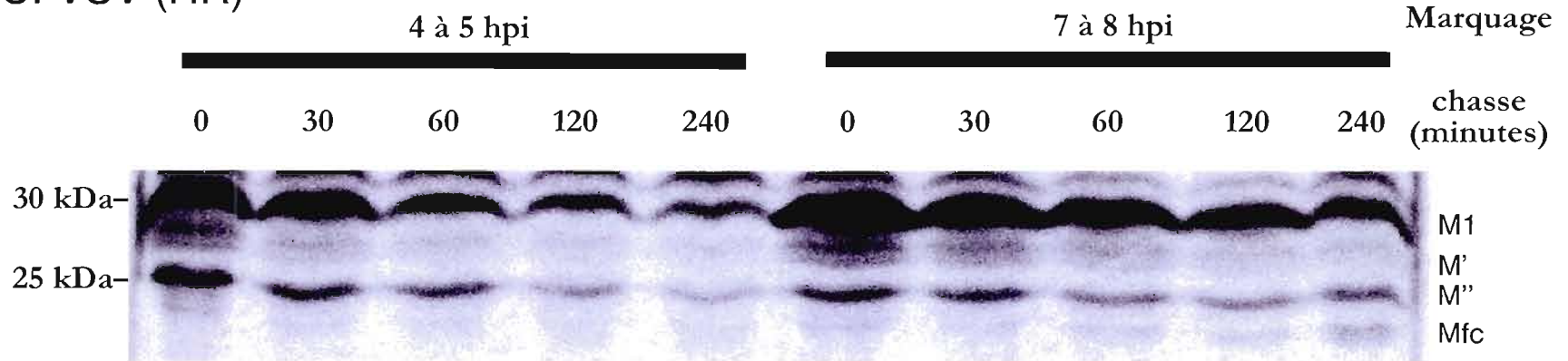
## B. VSV (T1026-R1)



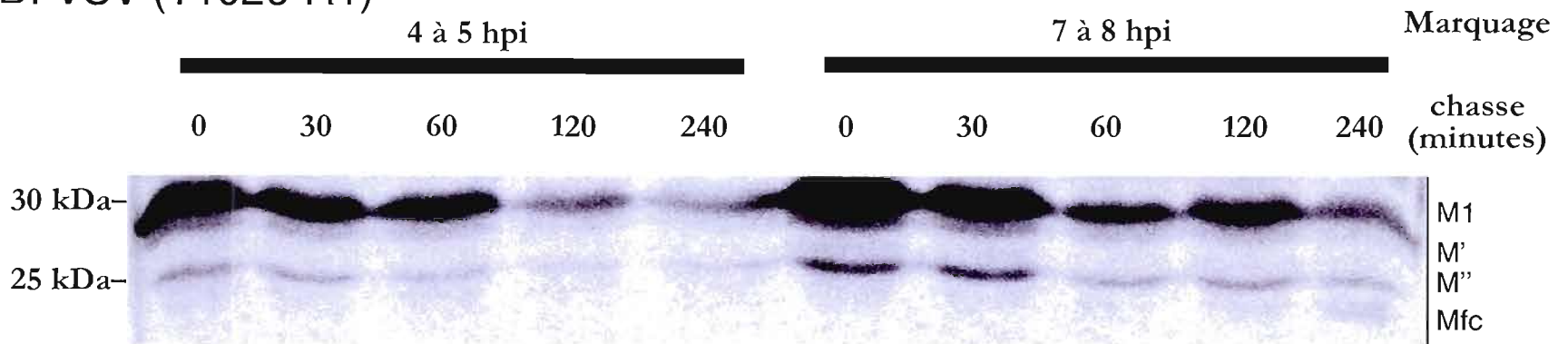


## Cellules BHK-21

### C. VSV (HR)



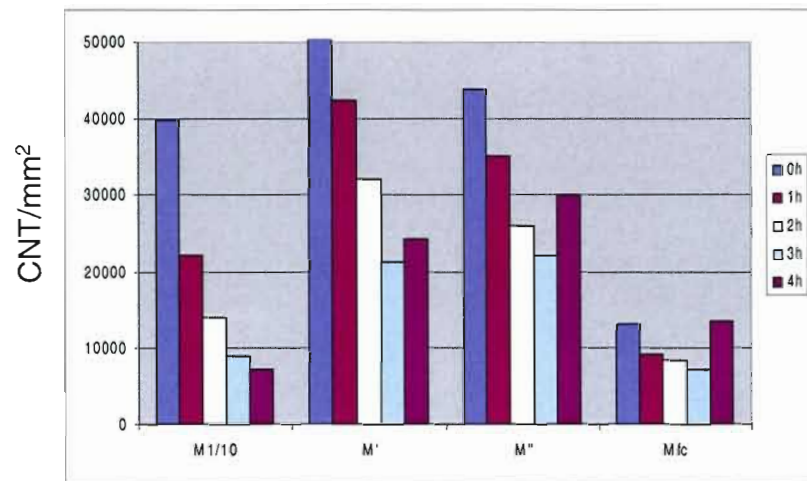
### D. VSV (T1026-R1)



# Cellules BHK-21

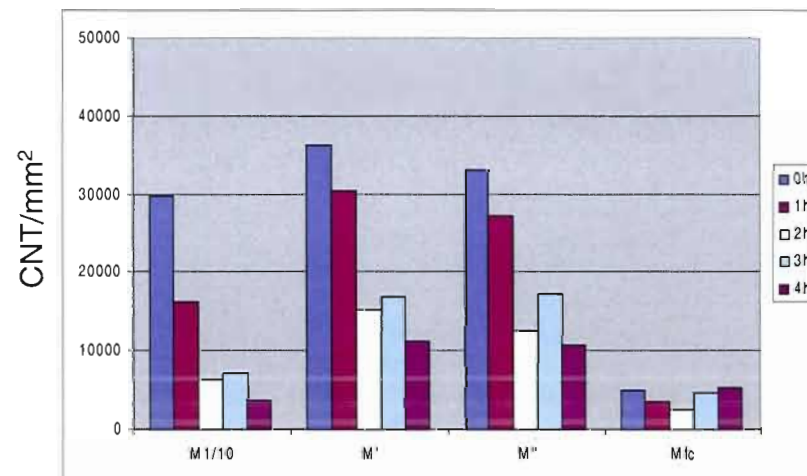
Marquage 7 à 8 hpi

## E. VSV (HR)



Temps  
de  
chasse

## F. VSV (T1026-R1)



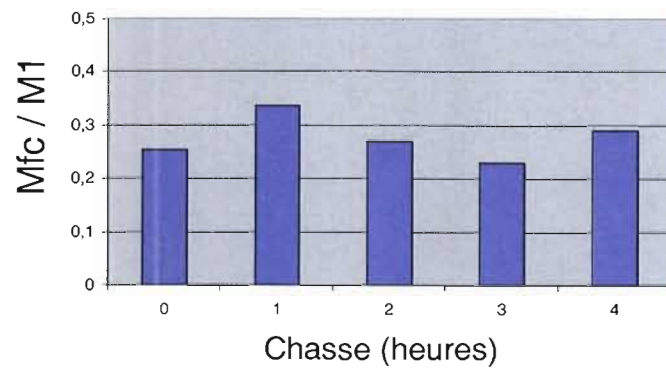
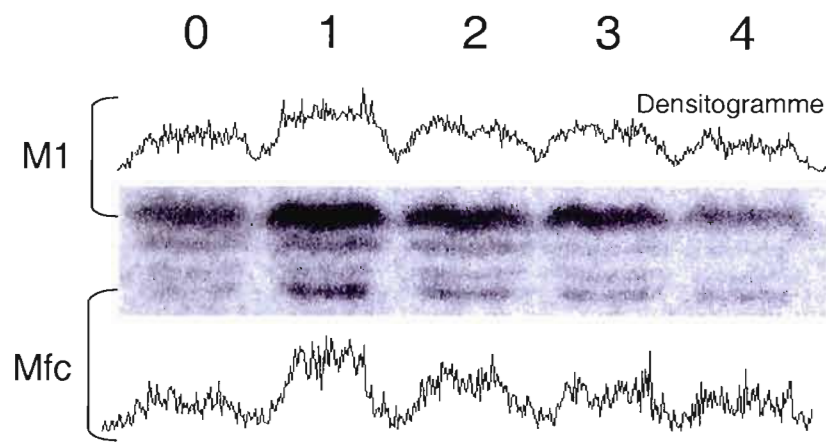
Temps  
de  
chasse



Figure 7

Expériences de type «pulse-chase» sur des cellules HeLa et BHK-21 infectées par le VSV (T1026-R1). À 10 hpi, les cellules ont subi un marquage radioactif (met/cys  $^{35}\text{S}$ , 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ) d'une heure pour ensuite être récoltées à différents temps post-marquage (0, 1, 2, 3 et 4h). Les protéines virales ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-VSV, séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%) puis analysées par autoradiographie. Les cellules non-infectées ont été récoltées 15 heures après l'infection placebo (résultat non-présenté). A : Cellules HeLa. B : Cellules BHK-21. Les histogrammes au bas de la figure présentent le ratio de la densité des bande Mfc sur celle des bandes M1 correspondantes pour chaque temps de chasse.

## A. Cellules HeLa



## B. Cellules BHK-21

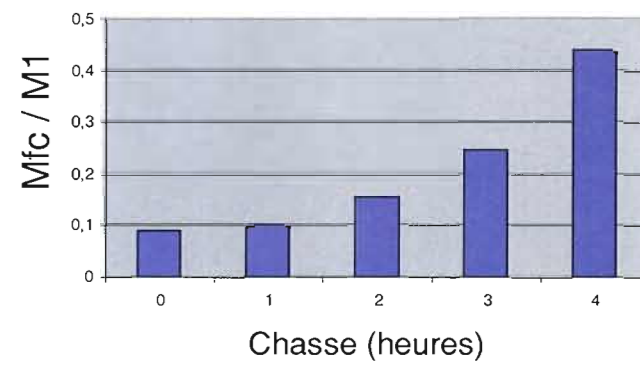
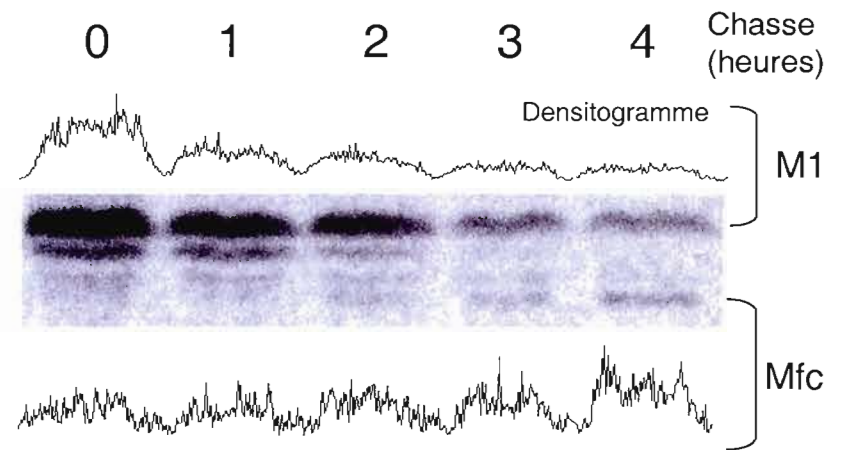


Figure 8

Test de dégradation de la protéine M par la caspase 3. Les protéines M sauvage ou mutante (M51R) provenant de l'isolat Orsay du VSV sérotype Indiana, et produites par expression bactérienne ont été purifiées et mises en présence de caspase 3 active. Des aliquots ont été prélevés à toutes les 15 minutes après le début de la réaction jusqu'à 90 minutes. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12%), puis transférées sur une membrane de PVDF. Un test de type immunobuvardage a été effectué avec l'anticorps monoclonal 23H12. Les témoins négatifs ont été incubés sans caspase.

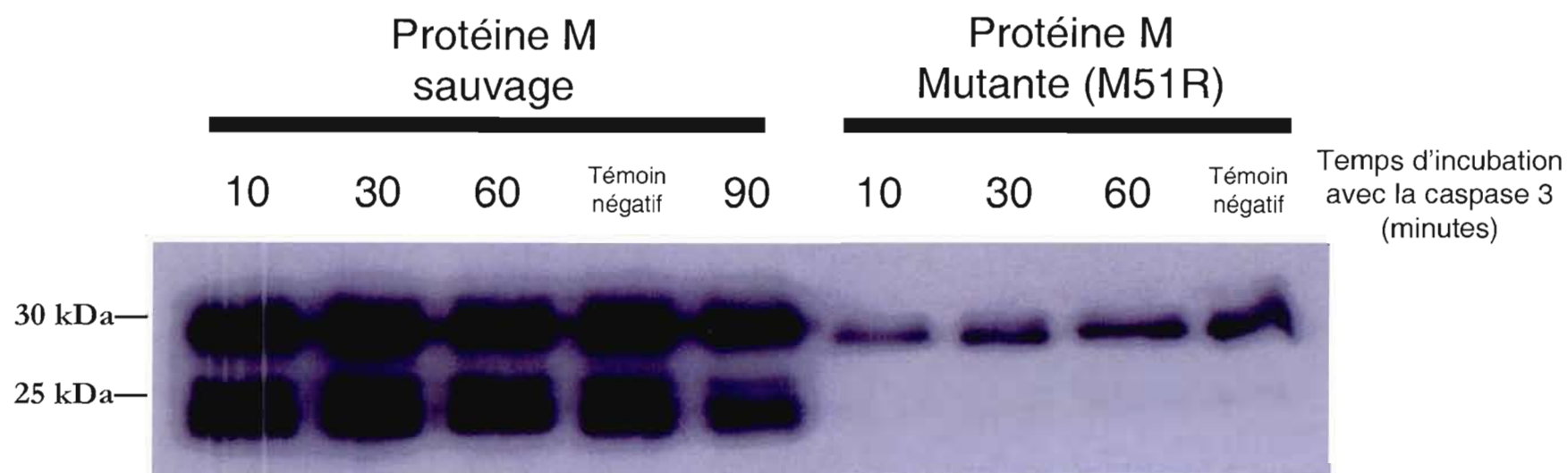
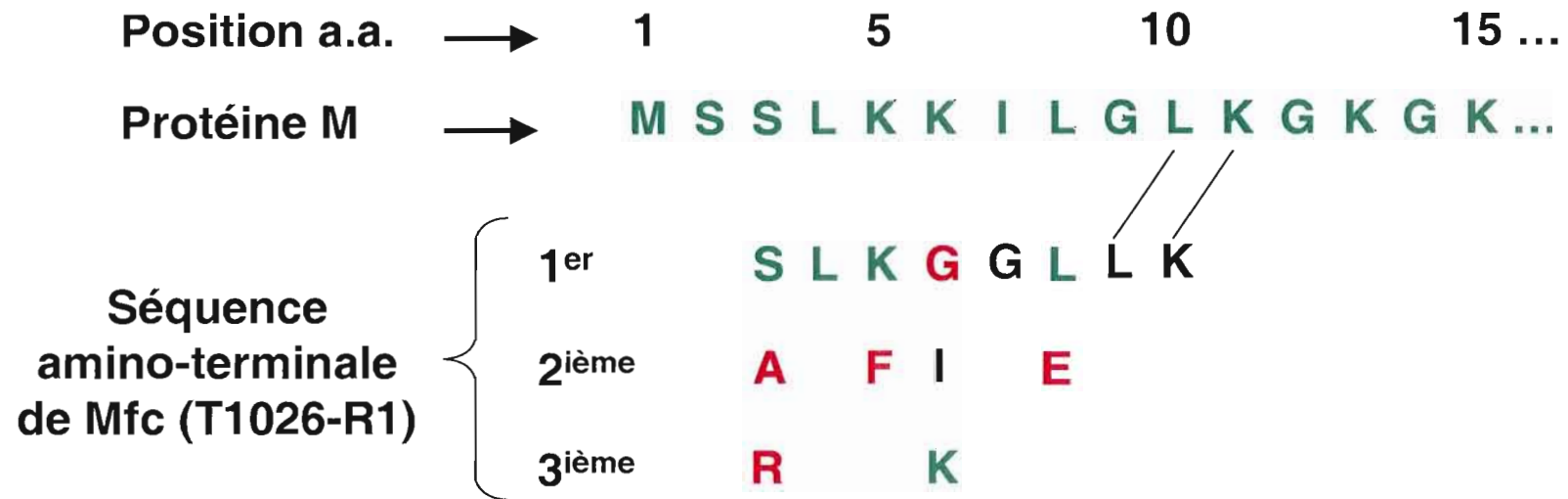


Figure 9

A. Séquence amino-terminale de la protéine Mfc du VSV (T1026-R1). Une préparation en grande quantité de la protéine Mfc (T1026-R1) a été soumise à une dégradation de Edman (voir section 2.8). Pour certaines positions, plus d'un acide aminé a été identifié par la méthode, mais avec un degré de possibilité variable. Ils sont présentés dans l'ordre du plus probable au moins probable. Le code de couleur représente le niveau d'homologie de chaque acide aminé du peptide obtenu avec ceux des positions 3 à 10 de l'extrémité amino-terminale de la protéine M. B. Séquence complète en acides aminés de la protéine M du virus de la Stomatite Vésiculeuse sérotype Indiana. L'unique mutation du variant T1026-R1 est indiquée en position 51 (M51R).

A.



B.

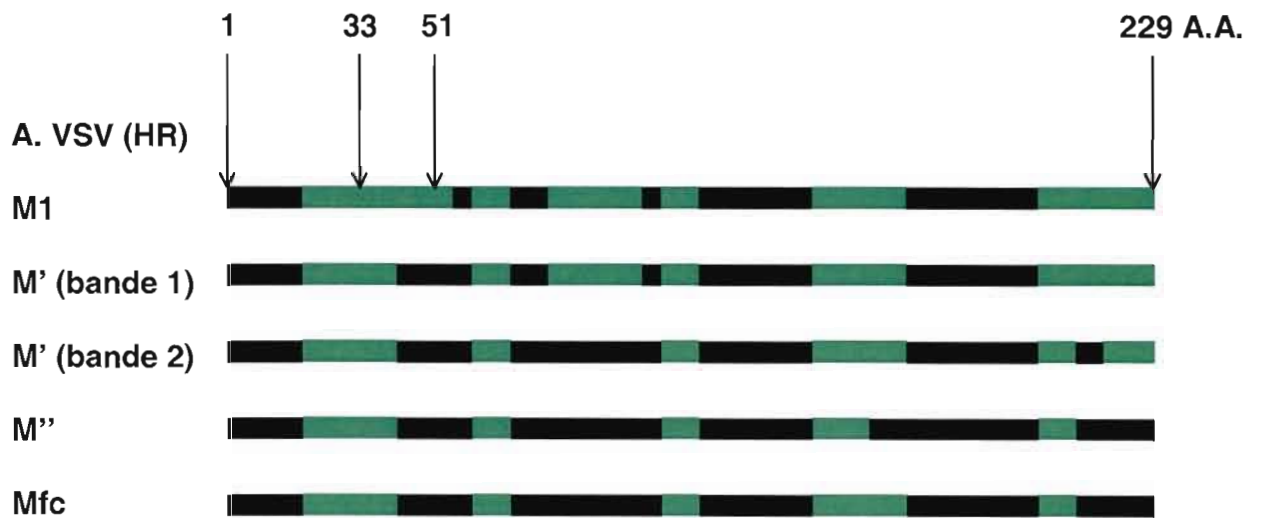
```

1  msslkakilgl kgkgkkskkl giapppyeed tsmeyapsap idksyfgvde mdtydpnqlr
                                     r (T1026-R1)

61  yekffftvkm tvrsnrpfrt ysdvaaavsh wdhmyigmag krpfykilaf lgssnlkatp
121 avladqggpe yhthcegray lphrmgktp mlnvpehfrr pfniglykgt ieltmtiydd
181 esleaapmiw dhfnsskfsd frekalmfgl ivekkasgaw vldsishfk
  
```

Figure 10

Représentation graphique des fragments tryptiques identifiés lors de l'analyse par spectrométrie de masse des différentes formes de M du VSV sauvage (A : HR) et mutant (B : T1026-R1). Les bandes du doublet M' (HR) ont été analysées séparément (identifiées bande 1 et bande 2). Les sections en vert représentent les portions de la protéine détectées par la méthode.



**B. VSV (T1026-R1)**

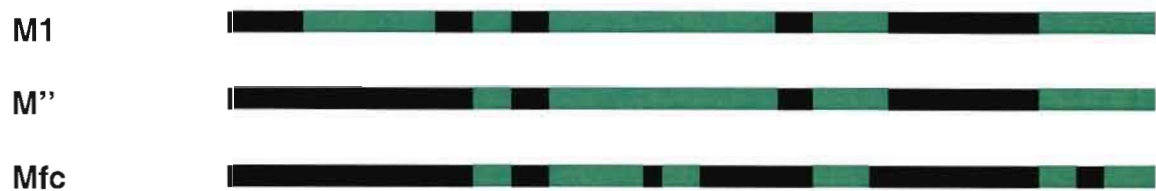
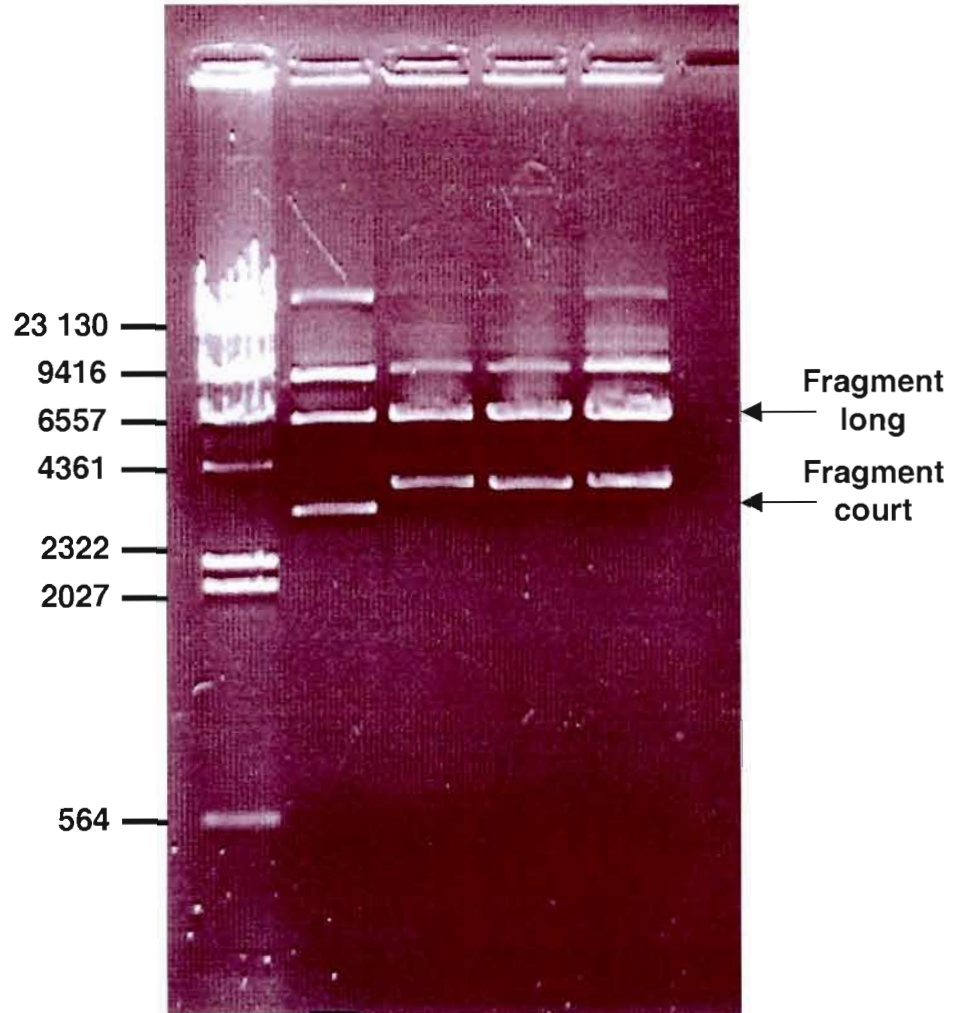




Figure 11

Gel d'agarose confirmant l'insertion des gènes M2, M3 et M2 (M51R) dans un vecteurs d'expression inductible. Les inserts sont présents à l'intérieur du fragment court du vecteur pL<sub>6</sub>N<sub>2</sub>-R<sub>H</sub>S3H/ZF2-PL produit à la suite d'une digestion avec l'enzyme de restriction *Dra*-I. (C- : contrôle négatif).

Paire  
de bases
  $\lambda$ 
C-
M2
M3
M2  
(M51R)



## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le phénomène d'initiation interne de la traduction permet au virus de la stomatite vésiculeuse d'augmenter la capacité codante de son génome par l'intermédiaire d'au moins deux de ses gènes. En effet, les trois premiers codons d'initiation (AUG) de l'ARNm de P, peuvent servir à produire les protéines P, C' et C respectivement. De ces protéines, c'est P qui est produite en plus grande quantité, dû au fait que son codon d'initiation de la traduction est le premier à être rencontré lorsque le ribosome balaie l'ARNm après son entrée sur la coiffe 5' (Spiropoulou et al., 1993). La raison pour laquelle, dans une certaine proportion, les ribosomes omettent d'initier la traduction à ce codon demeure nébuleuse car ce dernier est situé dans un excellent contexte (Kozak, 1986). Il a été suggéré que ce phénomène pourrait être dû à la nature très courte de la séquence UTR qui sépare la coiffe 5' du premier codon AUG (Kozak, 2002).

L'ARNm de la protéine M permet lui aussi la production de deux protéines supplémentaires : M2 et M3, grâce au phénomène d'initiation interne de la traduction (Jayakar et Whitt, 2002) et ceci ne peut être attribuable à la longueur de son UTR. Contrairement au cas de P, ces protéines additionnelles sont traduites à partir du même cadre de lecture que M et représentent des formes tronquées à l'extrémité amino-terminale de la protéine. L'existence de telles formes de M soulève la question de leur implication possible dans la réplication virale et dans la cytopathogenèse induite par le VSV. La présence de M2 et M3 a été démontrée à l'intérieur du virion, mais ce en très faible quantité par rapport à ce qui peut être observé à l'intérieur des cellules infectées (Jayakar et Whitt, 2002). Ce résultat montre bien la réduction des interactions possible de M2 et M3 avec la nucléocapside et les membranes, à cause de l'absence de la portion amino-

terminale de la protéine. Le même groupe est parvenu à redonner la capacité d'induire l'arrondissement cellulaire à un virus déficient pour cette caractéristique à cause de mutations sur sa protéine M (M33A, M51A, T133A, S226G), seulement en introduisant les gènes sauvages codant pour M2 et M3 à l'intérieur de son génome. Ce résultat suggère que les formes plus courtes de M pourraient être impliquées dans la cytopathogénèse induite lors de l'infection.

Dans le présent travail, diverses formes plus courtes de la protéine M ont été observées suite aux marquages radioactifs des cellules infectées par le VSV sauvage (HR). Les formes M2 et M3 identifiées par Jayakar et Whitt (2002) et résultant d'initiation aux AUG internes en position 33 et 51 ont des tailles apparemment similaires à celles des formes M'' ( $\approx 25$  kDa) et Mfc ( $\approx 22$  kDa) respectivement. De plus, l'absence de la forme Mfc immédiatement après la période de marquage 4 à 5 hpi des cellules infectées par le mutant T1026-R1 (figure 5-B et -D, colonnes 0), présumément due à la mutation M51R, semble confirmer que ces deux formes de M seraient le résultat de phénomènes d'initiation interne de la traduction.

Deux différences sont toutefois observées lorsque les résultats obtenus dans le présent travail sont comparés à ceux obtenus par l'équipe de Whitt. En premier lieu, ces derniers avaient constaté l'absence de la forme M2 lors d'un immunobuvardage effectué avec l'anticorps 23H12 sur des extraits protéiques provenant de cellules HeLa infectées par une souche sauvage du VSV alors que cette forme de M est bel et bien produite dans toutes les lignées cellulaires testées ici, incluant HeLa. En second lieu, l'absence de la forme M' dans les travaux présentés par Jayakar et Whitt. Ces différences, malgré des conditions expérimentales comparables, sont possiblement dues à de légères variations des conditions d'infection et de migration des extraits protéiques.

L'apparition séquentielle de M'' puis de Mfc, tel qu'observée lors de l'analyse d'extraits protéiques totaux par immunobuvardage avec l'anticorps

23H12 (figure 3), pourrait être due à une dégradation graduelle de la fiabilité des ribosomes à initier la traduction sur le premier codon AUG. En effet, il a déjà été démontré que certains facteurs d'initiations de la traduction, tel que eIF-4F et eIF-2, étaient altérés lors d'une infection par le VSV et que ces changements favorisaient la traduction des ARNm viraux au dépend des ARNm cellulaires (Connor et Lyles, 2005). Lors de la prise de contrôle de la machinerie de traduction par le virus (voir section 1.4.1.3), certains facteurs impliqués dans la fiabilité du mécanisme d'initiation de la traduction, tel que eIF5 (Huang et al., 1997), pourraient aussi être graduellement altérés de telle sorte que le ribosome commencerait à sauter le premier, puis le second codon d'initiation, au profit de ceux situés plus en aval. Dans ce cas, d'autres ARNm que celui de M seraient affectés et ceci permettrait d'expliquer l'existence des protéines C' et C produites à partir de l'ARNm de P.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'apparition séquentielle de formes plus courtes de M, implique l'activation de certaines protéases au cours de l'infection. L'apparition de Mfc lors d'infections par le mutant T1026-R1 ne peut pas être le résultat d'initiation interne de la traduction en position 51 à cause de la mutation M51R. L'existence de cette forme de M à l'intérieur des cellules infectées par ce mutant pourrait être due à un phénomène de protéolyse et l'augmentation de sa quantité lors de la chasse de protéines marquées semble confirmer cette hypothèse. Ce « processing » protéolytique de M pourrait être le même que celui déjà identifié lors de l'infection de cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary ») par une souche sauvage du VSV (Rosen et al., 1983), bien que la taille des produits protéiques observés par chaque groupe ne corresponde pas parfaitement (17,5 kDa vs  $\approx$  22 kDa). Cependant, contrairement aux cas d'infections par le mutant (T1026-R1), l'accumulation de Mfc à l'intérieur des cellules infectées par le VSV sauvage (HR) n'a pu être clairement observée. La forme Mfc semble donc être le résultat d'une initiation interne de la traduction en position 51 chez les cellules infectées par la souche sauvage du VSV (HR) alors que cette forme de M serait le résultat d'un clivage chez les cellules infectées par

le mutant T1026-R1. La mutation M51R pourrait alors créer ou mettre à jour un site de reconnaissance par une protéase.

La mise en place de l'apoptose chez les cellules infectées par le VSV induit l'activation d'une multitude de protéases cellulaires, dont les caspases. L'une de ces protéases, dont l'activité augmente au cours de l'infection, pourrait être responsable de l'apparition de la forme Mfc du mutant T1026-R1. Ceci permettrait d'expliquer la production plus efficace de cette forme de M plus tard dans l'infection (figure 7). L'inhibition de la production de Mfc lorsque des cellules L929 infectées par le VSV (T1026-R1) sont préalablement traitées avec un inhibiteur pan-caspases (z-VAD) appuie cette hypothèse (figure 5-D, colonne 4 + z-VAD). Cependant, ce phénomène n'a pu être observé lorsque des cellules HeLa ont été traitées de la même façon (figure 5-B, colonne 4 + z-VAD). Il est à noter que dans le cadre de cette étude, il n'a pu être démontré que M était un substrat de la caspase 3 malgré la présence d'un site analogue au site de reconnaissance par cette protéase autour de l'acide aminé 51 de M (DEM/RD) (figure 8).

L'apparition et la disparition de certaines formes plus courtes de M semblent avoir été influencées par une hétérogénéité dans la façon de manipuler et de lyser les cellules lors de la récolte (figure 5 vs figure 6). La différence majeure observée est l'absence de la forme M' immédiatement après la période de marquage à l'intérieur des extraits protéiques viraux présentés à la figure 5 (colonne 0). Lors de la récolte de ces échantillons, contrairement à tous les autres présentés aux figures 3 à 7, le surnageant cellulaire a été laissé de côté. Ceci suggère que la présence du milieu de culture lors de la récolte pourrait être à l'origine de la production de M'. Notons que ce clivage n'a pu être évité même avec la présence d'un cocktail d'inhibiteur complet (Complete mini EDTA-free, Roche) lors de la récolte et de la lyse des cellules dont les résultats sont présentés aux figures 3 et 6. Les résultats présentés aux figures 3 et 6 sont cependant plus fiables que ceux des figures 5 et 7 à cause d'une meilleure homogénéité dans la



technique de récolte des cellules et de la présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases dans le tampon de lyse utilisé lors de ce second test. Malgré cela, il est possible de comparer les résultats obtenus pour différentes souches virales ou différentes lignées cellulaires à l'intérieur d'un même test.

Ainsi, une différence intéressante a pu être observée entre les formes M' des souches virales sauvage (HR) et mutante (T1026-R1). En effet, à la figure 6, la forme M' du VSV (HR) se présente sous la forme d'un doublet, alors que celle du VSV (T1026-R1), sous la forme d'une bande simple. Même si la cause exacte et la signification de ce résultat restent à éclaircir, cette différence pourrait être due à la mutation M51R portée par la protéine M de T1026-R1. Entre autre, la bande supérieure du doublet pourrait co-migrer avec la protéine M mutante, connue pour migrer légèrement plus loin que la protéine sauvage dans un gel de polyacrylamide.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus pour les lignées cellulaires HeLa et BHK-21, plusieurs points semblent confirmer la différence de réponse à une infection par le VSV observée auparavant (Kopecky et Lyles, 2003). Tout d'abord, le démarrage plus lent de la production des protéines virale chez les cellules BHK-21 infectées par le VSV sauvage (HR) s'observe bien avec M. Tandis qu'à 5 hpi, la protéine M est déjà synthétisée abondamment à l'intérieur des cellules HeLa, sa production est beaucoup moins efficace chez les cellules BHK-21. Ce résultat montre une altération rapide de la machinerie de traduction des cellules HeLa et ceci va de pair avec une induction de l'apoptose plus efficace (Kopecky et Lyles, 2003). Fait à noter, l'apparition des formes M'' et Mfc est aussi beaucoup plus tardive chez les cellules BHK-21 (figure 3-B) et ceci pourrait retarder l'arrondissement cellulaire (Jayakar et Whitt, 2002). Aussi, la protéine M du VSV semble dégradée plus efficacement par les cellules BHK-21 (figure 6). Ceci pourrait participer à ralentir l'induction de l'apoptose chez ces dernières.

D'autres différences peuvent être observées entre les cellules HeLa et BHK-21 infectées par le mutant T1026-R1. Quoique les deux lignées cellulaires permettent la production de la protéine Mfc, la cinétique d'apparition de cette forme de M varie, particulièrement lors d'un marquage tardif (figure 7). En effet, dans ces conditions, la plus grande augmentation du ratio Mfc/M1 se produit dans la première heure de chasse chez les cellules HeLa tandis que cette augmentation est plus graduelle chez les cellules BHK-21. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'activité plus élevée d'une ou plusieurs protéases à l'intérieur des cellules HeLa à ce stade de l'infection.

Pour ce qui est de la lignée cellulaire L929, le groupe de Lyles avait déjà démontré un retard dans l'induction de l'apoptose induite par la souche sauvage du VSV semblable à celui observé chez les cellules BHK-21 comparativement aux cellules HeLa. Contrairement à ce qui était attendu, la production de protéines M chez les cellules L929 ressemble plus à ce qui est observé chez les cellules HeLa que chez les cellules BHK-21. En fait, les résultats présentés pour les L929 et les HeLa sont presque identiques. Ceci pourrait être dû à une dérivation ou une contamination par d'autres cellules de notre lignée cellulaire L929. Une autre possibilité est que le retard dans l'induction de l'apoptose des cellules L929 et BHK-21 par rapport aux cellules HeLa est dû à deux mécanismes distincts ou que la quantité de M et ses formes plus courtes présentes à l'intérieur d'une cellule à un temps donné n'est pas un bon indicateur de l'avancement de l'apoptose.

Les résultats obtenus lors de l'analyse des séquences de M ne permettent pas d'identifier quelle extrémité de la protéine est manquante chez les formes plus courtes (figures 9 et 10). Ces mêmes résultats semblent même indiquer que, malgré une migration plus loin dans le gel, les formes M', M'' et Mfc du VSV sauvage (HR) possèdent la séquence quasi-complète de la protéine. En effet, les portions manquantes aux deux extrémités des protéines M'' et Mfc, tel qu'identifiées lors de l'analyse par spectrométrie de masse, ne suffisent pas à expliquer une telle différence de poids moléculaire avec la forme pleine longueur



(M1). De plus, la quantité de protéine M'' et Mfc soumise à ces analyses étant très faible, l'absence de détection du fragment tryptique correspondant à l'extrémité carboxy-terminale pourrait être due à une sensibilité diminuée de la méthode. Un phénomène d'épissage alternatif de l'ARNm de M pourrait expliquer en partie ces observations. Cependant cette hypothèse fort peu probable dû au fait que les ARNm viraux produits dans le cytoplasme n'entrent jamais en contact avec la machinerie d'épissage présente exclusivement à l'intérieur du noyau et qu'aucun cas d'épissage n'a été décrit pour les ARNm du VSV à notre connaissance.

Ces observations pourraient être expliquées par une combinaison du phénomène d'initiation interne de la traduction avec un ou plusieurs événements de «processing» protéolytique. Dans ce cas, une protéine à laquelle il manque une portion à son extrémité amino-terminale pourrait co-migrer avec une autre à laquelle il manque une portion de longueur semblable à son extrémité carboxy-terminale. La présence de ces deux protéines à l'intérieur d'une même bande expliquerait la détection de fragments tryptiques correspondants aux deux extrémités de M lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

L'absence de portion amino-terminale chez la forme Mfc du VSV (T1026-R1) lors de l'analyse par spectrométrie de masse (figure 10-B) entre en contradiction avec le résultat obtenu par la méthode de dégradation de Edman pour cette même forme de M (figure 9). Rappelons encore une fois que l'existence de cette forme ne peut être expliquée par un cas d'initiation interne de la traduction en position 51 à cause de la mutation (M51R) et qu'un clivage semble la seule hypothèse plausible. Les résultats obtenus ici ne permettent cependant pas de statuer sur l'extrémité de la protéine Mfc à laquelle ce clivage pourrait avoir lieu.

Il a été démontré lors d'expériences de protéolyse limitée que la trypsine pouvait cliver la protéine M *in vitro* (Kaptur et al., 1991). La digestion prolongée de M à la trypsine entraîne la production d'une forme de la protéine d'environ 21

kDa à laquelle il manque les 43 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale. Cette forme est produite à partir de la protéine M à laquelle il manque déjà environ 19 acides aminés (possiblement M') à cause d'un premier clivage tryptique (Kaptur et al., 1995) et elle pourrait correspondre à la forme Mfc observée ici. Toutefois, si la récolte induisait une exposition prolongée à la trypsine, la production du doublet M' aurait d'abord été accentuée, puis on aurait pu observer l'apparition de la forme de 21 kDa. Ceci n'est pas observé lors des marquages 7 à 8 hpi des protéines virales chassées pendant 4 heures (figures 5 et 6). Si la production de Mfc est attribuable à un clivage par la trypsine, elle doit donc avoir lieu pendant l'infection. Toutefois, il est aussi possible qu'une autre protéase soit à l'origine de la production de la forme Mfc.

Enfin, les résultats présentés ici ont permis d'observer plusieurs différences entre les protéines M du VSV sauvage (HR) et mutant (T1026-R1). Deux de ces observations permettent d'avancer l'hypothèse que la mutation M51R portée par la protéine M de T1026-R1 pourrait introduire un site de clivage à cette position. Premièrement, une augmentation de la quantité de la forme Mfc au cours de la chasse de protéines marquées a été observée à l'intérieur des cellules infectées par T1026-R1. Cette augmentation n'a pu être observée de façon claire lors des infections par HR. De plus, le résultat des analyses par spectrométrie de masse, montre bien l'absence de la portion amino-terminale chez les formes M'' et Mfc de T1026-R1, alors que cette extrémité semble présente à l'intérieur des formes plus courtes de la protéine M de HR. On ne peut cependant éliminer la possibilité que ce fragment n'a pu être détecté par la méthode. L'introduction d'un tel site de clivage à l'intérieur de la protéine M du mutant T1026-R1 pourrait être liée à l'incapacité de la protéine à bloquer la synthèse protéique des cellules hôtes.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, le pool des formes plus courtes de la protéine M du VSV produit à l'intérieur d'une cellule infectée est plus complexe que ce qui avait été suggéré auparavant. Lors de la séparation sur gel d'extraits protéiques totaux provenant de cellules infectées, le patron observé montre au moins trois formes plus courtes de M et leur existence ne peut être expliquée exclusivement par le phénomène d'initiation interne de la traduction. Nous émettons l'hypothèse que certaines de ces formes pourraient être produites par un phénomène de protéolyse. L'activité de la ou les protéase(s) responsable(s) augmente au cours de l'infection et est sensible à l'inhibiteur pan-caspases z-VAD. La ou les protéases impliquée(s) reste(nt) à identifier ainsi que le rôle de ces produits protéiques dans la cytopathogénèse et le cycle de réplication du VSV.

Pour ce faire, différents inhibiteurs de protéases à spectres plus restreints devraient être testés lors d'autres expériences de « pulse-chase » effectués sur des cellules BHK-21 infectées par le mutant T1026-R1. Aussi, les expériences de séquençage de la forme M<sub>fc</sub> produite chez ce même mutant devraient être répétées, en tenant compte du fait que la protéine M est bloquée en n-terminal, ceci afin d'identifier l'extrémité de la protéine manquante et si possible, le site de clivage exact.

Afin de déterminer l'agent responsable du phénomène d'initiation interne de la traduction sur les l'ARNm de M et de P, il serait intéressant d'observer l'intégrité du facteur eIF5 responsable de la fiabilité du mécanisme d'initiation de la traduction, à différents temps post-infection et de vérifier si ce phénomène peut se produire sur d'autres ARNm viraux ou cellulaires au cours de l'infection.

## RÉFÉRENCES

- Abraham, G., Rhodes, D.P. and Banerjee, A.K. (1975) Novel initiation of RNA synthesis in vitro by vesicular stomatitis virus. *Nature* **255**, 37-40.
- Ahmed, M. and Lyles, D.S. (1998) Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J Virol* **72**, 8413-9.
- Alderete, J.P., Child, S.J. and Geballe, A.P. (2001) Abundant early expression of gpUL4 from a human cytomegalovirus mutant lacking a repressive upstream open reading frame. *J Virol* **75**, 7188-92.
- Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H. and Nakao, M. (1998) Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* **3**, 751-63.
- Balachandran, S. and Barber, G.N. (2000) Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* **50**, 135-8.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R. and Barber, G.N. (2000) Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **13**, 129-41.
- Baltzis, D., Qu, L.K., Papadopoulou, S., Blais, J.D., Bell, J.C., Sonenberg, N. and Koromilas, A.E. (2004) Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol* **78**, 12747-61.
- Barber, G.N. (2005) VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* **24**, 7710-9.
- Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P. and Ruigrok, R.W. (1993) Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol* **67**, 7246-53.
- Beausoleil, S. (1994) Protéine M de mutants P- du virus de la stomatite vésiculaire : modifications génétiques et effets sur la synthèse protéique. Mémoire de maîtrise. Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal. 71 p.
- Beckes, J.D. and Perrault, J. (1992) Stepwise phosphorylation of vesicular stomatitis virus P protein by virion-associated kinases and uncoupling of

second step from in vitro transcription. *Virology* **188**, 606-17.

- Black, B.L., Brewer, G. and Lyles, D.S. (1994) Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on host-directed translation in vivo. *J Virol* **68**, 555-60.
- Black, B.L., Rhodes, R.B., McKenzie, M. and Lyles, D.S. (1993) The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J Virol* **67**, 4814-21.
- Blondel, D., Harmison, G.G. and Schubert, M. (1990) Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **64**, 1716-25.
- Blumberg, B.M., Giorgi, C. and Kolakofsky, D. (1983) N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. *Cell* **32**, 559-67.
- Boisseau, I. (2006) Vecteur oncolytique viral permettant d'exprimer le gène codant pour la protéine M du virus de la stomatite vésiculaire sous le contrôle d'un système d'expression inductible. Mémoire de maîtrise. Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal.
- Brown, E.L. and Lyles, D.S. (2003) Organization of the vesicular stomatitis virus glycoprotein into membrane microdomains occurs independently of intracellular viral components. *J Virol* **77**, 3985-92.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K. and Billeter, M.A. (1989) Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56**, 759-64.
- Chong, L.D. and Rose, J.K. (1994) Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. *J Virol* **68**, 441-7.
- Coil, D.A. and Miller, A.D. (2004) Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* **78**, 10920-6.
- Coll, J.M. (1997) Synthetic peptides from the heptad repeats of the glycoproteins of rabies, vesicular stomatitis and fish rhabdoviruses bind phosphatidylserine. *Arch Virol* **142**, 2089-97.
- Connor, J.H. and Lyles, D.S. (2005) Inhibition of host and viral translation during vesicular stomatitis virus infection. eIF2 is responsible for the inhibition of viral but not host translation. *J Biol Chem* **280**, 13512-9.
- Connor, J.H. and Lyles, D.S. (2002) Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the

- eIF4E binding protein 4E-BP1. *J Virol* **76**, 10177-87.
- Coulon, P., Deutsch, V., Lafay, F., Martinet-Edelist, C., Wyers, F., Herman, R.C. and Flamand, A. (1990) Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Gen Virol* **71** (Pt 4), 991-6.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. and Matunis, M.J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-27.
- Curran, J. and Kolakofsky, D. (1990) Sendai virus P gene produces multiple proteins from overlapping open reading frames. *Enzyme* **44**, 244-9.
- Das, T., Mathur, M., Gupta, A.K., Janssen, G.M. and Banerjee, A.K. (1998) RNA polymerase of vesicular stomatitis virus specifically associates with translation elongation factor-1 alphabeta for its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1449-54.
- Davis, N.L. and Wertz, G.W. (1982) Synthesis of vesicular stomatitis virus negative-strand RNA in vitro: dependence on viral protein synthesis. *J Virol* **41**, 821-32.
- Desforges, M., Charron, J., Berard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D.F., Despars, G., Laverdiere, B., Bell, J.C., Talbot, P.J., Stanners, C.P. and Poliquin, L. (2001) Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res* **76**, 87-102.
- Desforges, M., Despars, G., Berard, S., Gosselin, M., McKenzie, M.O., Lyles, D.S., Talbot, P.J. and Poliquin, L. (2002) Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **295**, 63-73.
- Ezelle, H.J., Markovic, D. and Barber, G.N. (2002) Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J Virol* **76**, 12325-34.
- Faria, P.A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G.N., Ezelle, H.J., Enninga, J., Arana, C., van Deursen, J. and Fontoura, B.M. (2005) VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Mol Cell* **17**, 93-102.
- Ferran, M.C. and Lucas-Lenard, J.M. (1997) The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol* **71**, 371-7.
- Flanagan, E.B., Zamparo, J.M., Ball, L.A., Rodriguez, L.L. and Wertz, G.W. (2001) Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates

- clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J Virol* **75**, 6107-14.
- Fontoura, B.M., Faria, P.A. and Nussenzveig, D.R. (2005) Viral interactions with the nuclear transport machinery: discovering and disrupting pathways. *IUBMB Life* **57**, 65-72.
- Francoeur, A.M., Poliquin, L. and Stanners, C.P. (1987) The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* **160**, 236-45.
- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A.G. and Sachs, M.S. (2001) Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *EMBO J* **20**, 6453-63.
- Gaddy, D.F. and Lyles, D.S. (2005) Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J Virol* **79**, 4170-9.
- Gallione, C.J. and Rose, J.K. (1983) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **46**, 162-9.
- Gao, Y., Greenfield, N.J., Cleverley, D.Z. and Lenard, J. (1996) The transcriptional form of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is a trimer: structure and stability. *Biochemistry* **35**, 14569-73.
- Garbutt, M., Liebscher, R., Wahl-Jensen, V., Jones, S., Moller, P., Wagner, R., Volchkov, V., Klenk, H.D., Feldmann, H. and Stroher, U. (2004) Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* **78**, 5458-65.
- Gaudier, M., Gaudin, Y. and Knossow, M. (2002) Crystal structure of vesicular stomatitis virus matrix protein. *EMBO J* **21**, 2886-92.
- Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63.
- Glodowski, D.R., Petersen, J.M. and Dahlberg, J.E. (2002) Complex nuclear localization signals in the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* **277**, 46864-70.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-108.

- Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A. and Schnell, M.J. (2001) Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol* **75**, 10623-9.
- Her, L.S., Lund, E. and Dahlberg, J.E. (1997) Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* **276**, 1845-8.
- Herman, R.C. (1986) Internal initiation of translation on the vesicular stomatitis virus phosphoprotein mRNA yields a second protein. *J Virol* **58**, 797-804.
- Huang, H.K., Yoon, H., Hannig, E.M. and Donahue, T.F. (1997) GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 2396-413.
- Irie, T., Licata, J.M., Jayakar, H.R., Whitt, M.A., Bell, P. and Harty, R.N. (2004) Functional analysis of late-budding domain activity associated with the PSAP motif within the vesicular stomatitis virus M protein. *J Virol* **78**, 7823-7.
- Iverson, L.E. and Rose, J.K. (1981) Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* **23**, 477-84.
- Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N. and Deng, M. (2005) Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 623-60.
- Jayakar, H.R., Jeetendra, E. and Whitt, M.A. (2004) Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res* **106**, 117-32.
- Jayakar, H.R. and Whitt, M.A. (2002) Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology. *J Virol* **76**, 8011-8.
- Justice, P.A., Sun, W., Li, Y., Ye, Z., Grigera, P.R. and Wagner, R.R. (1995) Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **69**, 3156-60.
- Kahn, J.S., Roberts, A., Weibel, C., Buonocore, L. and Rose, J.K. (2001) Replication-competent or attenuated, nonpropagating vesicular stomatitis viruses expressing respiratory syncytial virus (RSV) antigens protect mice against RSV challenge. *J Virol* **75**, 11079-87.
- Kaptur, P.E., McKenzie, M.O., Wertz, G.W. and Lyles, D.S. (1995) Assembly functions of vesicular stomatitis virus matrix protein are not disrupted by mutations at major sites of phosphorylation. *Virology* **206**, 894-903.



- Kaptur, P.E., Rhodes, R.B. and Lyles, D.S. (1991) Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids. *J Virol* **65**, 1057-65.
- Kato, A., Ohnishi, Y., Kohase, M., Saito, S., Tashiro, M. and Nagai, Y. (2001) Y2, the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the antiviral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J Virol* **75**, 3802-10.
- Kido, H., Chen, Y., Yamada, H. and Okumura, Y. (2003) [Host cellular proteases trigger the infectivity of the influenza virus in the airway and brain]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **122**, 45-53.
- Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y. and Towatari, T. (1999) Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells* **9**, 235-44.
- Kiefer, P., Acland, P., Pappin, D., Peters, G. and Dickson, C. (1994) Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3. *EMBO J* **13**, 4126-36.
- Kopecky, S.A. and Lyles, D.S. (2003) The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death. *J Virol* **77**, 5524-8.
- Kopecky, S.A., Willingham, M.C. and Lyles, D.S. (2001) Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* **75**, 12169-81.
- Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947-50.
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-92.
- Kozak, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**, 1-34.
- Kretzschmar, E., Peluso, R., Schnell, M.J., Whitt, M.A. and Rose, J.K. (1996) Normal replication of vesicular stomatitis virus without C proteins. *Virology* **216**, 309-16.
- Kurath, G., Ahern, K.G., Pearson, G.D. and Leong, J.C. (1985) Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *J Virol* **53**, 469-76.

- Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A. and Rose, J.K. (1995) Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4477-81.
- Laverdière, B. (2000) Études des l'effets de l'interféron et de la protéine Bcl-2 lors de l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire. Mémoire de maîtrise. Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal. 110 p.
- Lefrancois, L. and Lyles, D.S. (1982) The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies of nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* **121**, 168-74.
- Lenard, J. and Vanderoef, R. (1990) Localization of the membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe 125I-TID. *J Virol* **64**, 3486-91.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L. and Del carrera, J. (1999) Vesicular stomatitis. *Vet J* **157**, 239-60.
- Lodish, H.F. and Porter, M. (1980) Heterogeneity of vesicular stomatitis virus particles: implications for virion assembly. *J Virol* **33**, 52-8.
- Lopez-Otin, C. and Overall, C.M. (2002) Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 509-19.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Lyles, D.S., McKenzie, M. and Parce, J.W. (1992) Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J Virol* **66**, 349-58.
- Lyles, D.S. and McKenzie, M.O. (1997) Activity of vesicular stomatitis virus M protein mutants in cell rounding is correlated with the ability to inhibit host gene expression and is not correlated with virus assembly function. *Virology* **229**, 77-89.
- Lyles, D.S. and McKenzie, M.O. (1998) Reversible and irreversible steps in assembly and disassembly of vesicular stomatitis virus: equilibria and kinetics of dissociation of nucleocapsid-M protein complexes assembled in vivo. *Biochemistry* **37**, 439-50.
- Lyles, D.S., McKenzie, M.O. and Hantgan, R.R. (1996) Stopped-flow, classical, and dynamic light scattering analysis of matrix protein binding to nucleocapsids of vesicular stomatitis virus. *Biochemistry* **35**, 6508-18.

- Lyles, D.S., Puddington, L. and McCreedy, B.J. Jr (1988) Vesicular stomatitis virus M protein in the nuclei of infected cells. *J Virol* **62**, 4387-92.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K. (1982) Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol* **156**, 609-31.
- Mebatsion, T., Weiland, F. and Conzelmann, K.K. (1999) Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* **73**, 242-50.
- Melki, R., Gaudin, Y. and Blondel, D. (1994) Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* **202**, 339-47.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-21.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1999) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-9.
- Pager, C.T. and Dutch, R.E. (2005) Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein. *J Virol* **79**, 12714-20.
- Peluso, R.W., Richardson, J.C., Talon, J. and Lock, M. (1996) Identification of a set of proteins (C' and C) encoded by the bicistronic P gene of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus and analysis of their effect on transcription by the viral RNA polymerase. *Virology* **218**, 335-42.
- Petersen, J.M., Her, L.S., Varvel, V., Lund, E. and Dahlberg, J.E. (2000) The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* **20**, 8590-601.
- Pisarev, A.V., Shirokikh, N.E. and Hellen, C.U. (2005) Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol* **328**, 589-605.
- Podlaski, F.J., Stern, A.S. (2000) Site-specific immobilization on antibodies to protein G-derivatized solid supports., (Eds.), Affinity Chromatography: Methods and Protocols, *Humana Press inc.*, pp. 41-48
- Powers, M.A., Forbes, D.J., Dahlberg, J.E. and Lund, E. (1997) The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol* **136**, 241-50.

- Riechmann, J.L., Ito, T. and Meyerowitz, E.M. (1999) Non-AUG initiation of AGAMOUS mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* **19**, 8505-12.
- Rigaut, K.D., Birk, D.E. and Lenard, J. (1991) Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *J Virol* **65**, 2622-8.
- Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J. and Rose, J.K. (1999) Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**, 3723-32.
- Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A.S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y. and Rose, J.K. (1998) Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J Virol* **72**, 4704-11.
- Robison, C.S. and Whitt, M.A. (2000) The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol* **74**, 2239-46.
- Rolls, M.M., Webster, P., Balba, N.H. and Rose, J.K. (1994) Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* **79**, 497-506.
- Rose, J.K. (1978) Complete sequences of the ribosome recognition sites in vesicular stomatitis virus mRNAs: recognition by the 40S and 80S complexes. *Cell* **14**, 345-53.
- Rose, J.K. and Gallione, C.J. (1981) Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *J Virol* **39**, 519-28.
- Rose, N.F., Roberts, A., Buonocore, L. and Rose, J.K. (2000) Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**, 10903-10.
- Rose, J.K., Whitt, M.A. (2001) Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In : Knipe, D., Howley, P.M., (Eds.), *Fields Virology*, Fourth ed., *Lippincott Williams & Wilkins*, PA, pp. 1221-1244
- Rosen, C.A., Cohen, P.S. and Ennis, H.L. (1983) Identification of a new protein present in vesicular stomatitis virus-infected Chinese hamster ovary cells as a degradation product of viral M protein. *Virology* **130**, 331-41.
- Schlereth, B., Germann, P.G., ter Meulen, V. and Niewiesk, S. (2000) DNA vaccination with both the haemagglutinin and fusion proteins but not the

- nucleocapsid protein protects against experimental measles virus infection. *J Gen Virol* **81**, 1321-5.
- Schnell, M.J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H.P., Chernish, R. and Rose, J.K. (1998) Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *EMBO J* **17**, 1289-96.
- Schnell, M.J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E. and Rose, J.K. (1996) Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11359-65.
- Schubert, M., Keene, J.D., Herman, R.C. and Lazzarini, R.A. (1980) Site on the vesicular stomatitis virus genome specifying polyadenylation and the end of the L gene mRNA. *J Virol* **34**, 550-9.
- Spiropoulou, C.F. and Nichol, S.T. (1993) A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **67**, 3103-10.
- Stanners, C.P., Francoeur, A.M. and Lam, T. (1977) Analysis of VSV mutant with attenuated cytopathogenicity: mutation in viral function, P, for inhibition of protein synthesis. *Cell* **11**, 273-81.
- Stojdl, D.F., Abraham, N., Knowles, S., Marius, R., Brasey, A., Lichty, B.D., Brown, E.G., Sonenberg, N. and Bell, J.C. (2000) The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* **74**, 9580-5.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. and Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* **4**, 263-75.
- Tesh, R.B., Peralta, P.H. and Johnson, K.M. (1969) Ecologic studies of vesicular stomatitis virus. I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity. *Am J Epidemiol* **90**, 255-61.
- Thomsen, A.R., Nansen, A., Andersen, C., Johansen, J., Marker, O. and Christensen, J.P. (1997) Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. *Int Immunol* **9**, 1757-66.
- von Kobbe, C., van Deursen, J.M., Rodrigues, J.P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E. (2000) Vesicular

stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol Cell* **6**, 1243-52.

Whelan, S.P. and Wertz, G.W. (1999) Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. *J Virol* **73**, 297-306.

Ye, Z., Sun, W., Suryanarayana, K., Justice, P., Robinson, D. and Wagner, R.R. (1994) Membrane-binding domains and cytopathogenesis of the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **68**, 7386-96.

Yuan, H., Puckett, S. and Lyles, D.S. (2001) Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J Virol* **75**, 4453-8.